

#10
JP

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Katsuhide MIYAKE *et al.*

Appln. No.: 09/900,038

Group Art Unit: 1652

Filed: July 9, 2001

Examiner: Slobodyansky, Elizabeth, PhD

For: β 1,3-GALACTOSYLTRANSFERASE AND DNA ENCODING THE SAME

DECLARATION

Assistant Commissioner for Patents

Washington, D.C. 20231

Sir/Madam:

I, Eiichi Kobayashi, do declare and state that:

I graduated from the University of Tokyo, Faculty of Agriculture, Department in Agricultural Chemistry, having received a Master's Degree of Agriculture in March, 1992.

I understand the Japanese and English languages. Attachment A is a copy of Japanese Patent Application No. 2001-392, filed January 5, 2001, the claim to the priority date of which application was made in the above-identified U.S. patent application, and Attachment B is an accurate English translation made by me of Attachment A.

I declare further that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Date: February 3, 2003

Name: 
Eiichi Kobayashi

B

[Document]	Patent Application
[Reference No.]	H12-211A4
[Special item]	Patent application based on Patent Act 30, Article 1
[Date of filing]	January 5, 2001
[Attention to]	Commissioner, Patent Office
[ITC]	C12P 19/00
[Inventor]	
[Address]	c/o Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi
[Name]	Katsuhide MIYAKE
[Inventor]	
[Address]	c/o Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi
[Name]	Masaki WATANABE
[Inventor]	
[Address]	c/o Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi
[Name]	Shinji IJIMA
[Applicant for Patent]	
[Identification No.]	000001029
[Name or Appellation]	Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.
[Representative]	Tadashi Hirata
[Identification of Fees]	
[Prepayment Account No.]	008187
[Amount of Fees Payable]	21000
[List of Documents to Be Submitted]	
[Document]	Specification 1
[Document]	Drawing 1
[Document]	Abstract 1
[Request of Proof]	Yes

(Document name)

(Title of the invention)

β 1,3-GALACTOSYLTRANSFERASE AND DNA ENCODING THE
SAME

(Scope of the claims)

(Claim 1) A protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity derived from a microorganism having an activity of transferring galactose to N-acetylglucosamine with β 1,3-linkage.

(Claim 2) The protein according to claim 1, wherein the microorganism belongs to the genus *Streptococcus*.

(Claim 3) The protein according to claim 2, wherein the microorganism is *Streptococcus agalactiae*.

(Claim 4) A protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1.

(Claim 5) A protein comprising an amino acid sequence in which at least one amino acid is deleted, replaced, inserted or added in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, said protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity.

(Claim 6) A DNA encoding the protein of any one of claims 1 to 5.

(Claim 7) A DNA comprising the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2.

(Claim 8) A DNA which hybridizes with a DNA comprising the complementary sequence to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 under stringent conditions, and encodes a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity.

(Claim 9) A recombinant DNA comprising the DNA of any one of claims 6 to 8 and a vector.

(Claim 10) A transformant obtained by introducing the recombinant DNA of claim 9 into a host cell.

(Claim 11) The transformant according to claim 10, wherein the host cell is a microorganism.

(Claim 12) The transformant according to claim 11, wherein the microorganism belongs to the genus *Escherichia*.

(Claim 13) The transformant according to claim 12, wherein the microorganism belonging to the genus *Escherichia* is *Escherichia coli*.

(Claim 14) A method for producing a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity, comprising culturing the transformant of any one of claims 10 to 13 in a medium to produce and accumulate a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity in the culture, and recovering the protein from the culture.

(Claim 15) A method for producing a galactose-containing carbohydrate, comprising selecting, as an enzyme source, a culture of the transformant of any one of claims 10 to 13 or a treated product of the culture, allowing the

enzyme source, uridine-5'-diphosphogalactose and an acceptor carbohydrate to be present in an aqueous medium to produce and accumulate the galactose-containing carbohydrate in the aqueous medium, and recovering the galactose-containing carbohydrate from the aqueous medium.

(Claim 16) The method according to claim 15, wherein the treated product of the culture is selected from the group consisting of a concentrated product of the culture, a dried product of the culture, cells obtained by centrifuging the culture, a dried product of the cells, a freeze-dried product of the cells, a surfactant-treated product of the cells, an ultrasonic-treated product of the cells, a mechanically disrupted product of the cells, a solvent-treated product of the cells, an enzyme-treated product of the cells, a protein fraction of the cells, an immobilized product of the cells and an enzyme preparation obtained by extracting from the cells.

(Claim 17) The method according to claim 15, wherein the acceptor carbohydrate is a carbohydrate having *N*-acetylglucosamine at its non-reducing terminal.

(Claim 18) The method according to claim 15, wherein the acceptor carbohydrate is selected from the group consisting of *N*-acetylglucosamine and lacto-*N*-triose II.

(Claim 19) The method according to claim 15, wherein the galactose-containing carbohydrate is selected

from the group consisting of lacto-*N*-biose and lacto-*N*-tetraose.

(Detailed description of the invention)

(0001)

(Technical filed to which the invention belongs)

The present invention relates to a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity, a DNA encoding the protein, a recombinant DNA containing the DNA, a transformant containing the recombinant DNA, a method for producing a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity using the transformant, and a method for producing a galactose-containing carbohydrate using the transformant.

(0002)

(Background art)

Regarding β 1,3-galactosyltransferase genes, the genes derived from higher animal (*J. Biol. Chem.*, 273: 58 (1998), *J. Biol. Chem.*, 273: 12770 (1998), *J. Biol. Chem.*, 274: 12499 (1999)) have been obtained. However, since it is generally difficult to express the genes derived from higher-animal as active proteins in microorganisms, a β 1,3-galactosyltransferase gene derived from higher-animal has not been expressed as an active protein in a microorganism such as *Escherichia coli* or the like.

(0003)

On the other hand, in microorganisms, there is a report stating that a β 1,3-galactosyltransferase gene was

obtained from *Campylobacter jejuni* and the gene was expressed in *Escherichia coli*. However, although this enzyme has an activity of transferring galactose to *N*-acetylgalactosamine, there is no report about the activity of transferring galactose to *N*-acetylglucosamine (*J. Biol. Chem.*, 274: 12499 (1999)).

(0004)

Human milk abundantly contains galactose-containing carbohydrates, lacto-*N*-tetraose being one of the main components (*Acta Paediatr.*, 82: 903 (1993), *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 30: 181 (2000)). Since it is known that lacto-*N*-tetraose and lacto-*N*-neotetraose, which are the galactose-containing carbohydrates, are recognized by *Pseudomonas aeruginosa* (*Infect. Immun.*, 59: 700 (1991)), the galactose-containing carbohydrates are considered to be strong candidates for safe antiinfection drugs which can prevent human body from infection with *Pseudomonas aeruginosa*.

(0005)

Regarding production of a galactose-containing carbohydrate such as lacto-*N*-tetraose or the like, both the methods of extraction from human milk and chemical synthesis are known but such methods have problems in terms of cost and productivity, so that its industrial production method has not yet been established.

(0006)

(Problems to be solved by the invention)

An object of the present invention is to provide a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity, a DNA encoding the protein, a method for producing a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity using a transformant containing the DNA, and a method for producing a galactose-containing carbohydrate using the protein.

(0007)

(Means to solve the problems)

In order to solve the above problems, the present inventors have conducted intensive studies and found a novel β 1,3-galactosyltransferase, among enzymes concerning capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus agalactiae*, and have isolated the DNA encoding such enzyme.

(0008)

Specifically, the present invention relates to the following (1) to (19):

- (1) A protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity derived from a microorganism having an activity of transferring galactose to N-acetylglucosamine with β 1,3-linkage.
- (2) The protein according to (1), wherein the microorganism belongs to the genus *Streptococcus*.
- (3) The protein according to (2), wherein the microorganism is *Streptococcus agalactiae*.

(4) A protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1.

(5) A protein comprising an amino acid sequence in which at least one amino acid is deleted, replaced, inserted or added in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, said protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity.

(6) A DNA encoding the protein of any one of (1) to (5).

(7) A DNA comprising the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2.

(8) A DNA which hybridizes with a DNA comprising the complementary sequence to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 under stringent conditions, and encodes a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity.

(9) A recombinant DNA comprising the DNA of any one of (6) to (8) and a vector.

(10) A transformant obtained by introducing the recombinant DNA of (9) into a host cell.

(11) The transformant according to (10), wherein the host cell is a microorganism.

(12) The transformant according to (11), wherein the microorganism belongs to the genus *Escherichia*.

(13) The transformant according to (12), wherein the microorganism belonging to the genus *Escherichia* is *Escherichia coli*.

(14) A method for producing a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity, comprising culturing the transformant of any one of (10) to (13) in a medium to produce and accumulate a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity in the culture, and recovering the protein from the culture.

(15) A method for producing a galactose-containing carbohydrate, comprising selecting, as an enzyme source, a culture of the transformant of any one of (10) to (13) or a treated product of the culture, allowing the enzyme source, uridine-5'-diphosphogalactose and an acceptor carbohydrate to be present in an aqueous medium to produce and accumulate the galactose-containing carbohydrate in the aqueous medium, and recovering the galactose-containing carbohydrate from the aqueous medium.

(16) The method according to (15), wherein the treated product of the culture is selected from the group consisting of a concentrated product of the culture, a dried product of the culture, cells obtained by centrifuging the culture, a dried product of the cells, a freeze-dried product of the cells, a surfactant-treated product of the cells, an ultrasonic-treated product of the cells, a mechanically disrupted product of the cells, a solvent-treated product of the cells, an enzyme-treated product of the cells, a protein fraction of the cells, an

immobilized product of the cells and an enzyme preparation obtained by extracting from the cells.

(17) The method according to (15), wherein the acceptor carbohydrate is a carbohydrate having *N*-acetylglucosamine at its non-reducing terminal.

(18) The method according to (15), wherein the acceptor carbohydrate is selected from the group consisting of *N*-acetylglucosamine and lacto-*N*-triose II.

(19) The method according to (15), wherein the galactose-containing carbohydrate is selected from the group consisting of lacto-*N*-biose and lacto-*N*-tetraose.

(0009)

(Embodiments for carrying out the invention)

The protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity of the present invention is a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity derived from a microorganism which uses, as a substrate, an acceptor carbohydrate having *N*-acetylglucosamine (hereinafter referred to as "GlcNAc") on its non-reducing terminal. For example, preferred is a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity derived from a microorganism belonging to the genus *Streptococcus*, and more preferred is a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity derived from *Streptococcus agalactiae*.

(0010)

Specifically, the protein of the present invention includes a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, and a protein comprising an amino acid sequence in which at most 20 amino acids are deleted, replaced, inserted or added in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 and having a β 1,3-galactosyltransferase activity.

(0011)

The modified protein can readily be obtained using a method for introducing site-directed mutation(s) described in, for example, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (hereinafter referred to as "*Molecular Cloning*, 2nd ed."), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987-1997) (hereinafter referred to as "*Current Protocols in Molecular Biology*"), *Nuc. Acids. Res.*, 10: 6487 (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 6409 (1982), *Gene*, 34: 315 (1985), *Nuc. Acids. Res.*, 13: 4431 (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 488 (1985) and the like. For example, the protein can be obtained by introducing mutation(s) to DNA encoding a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2.

(0012)

The number of the amino acids which are deleted, replaced, inserted or added is not particularly limited;

however, it is usually 1 to 20, preferably 1 to 10, and more preferably 1 to 5, amino acids.

Also, in order to have the β 1,3-galactosyltransferase activity of the protein of the present invention, it has preferably at least 50% or more, preferably 60% or more, still more preferably 80% or more, most preferably 95% or more, of identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1.

(0013)

The DNA of the present invention includes a DNA encoding the protein of the present invention.

Specific examples include a DNA encoding a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, a DNA comprising the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2, and a DNA which hybridizes with a DNA comprising the complementary sequence to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 under stringent conditions and encodes a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity.

(0014)

The DNA which hybridizes under stringent conditions is a DNA obtained by colony hybridization, plaque hybridization, Southern hybridization or the like using, as a probe, the DNA comprising the complementary sequence to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2. Specific examples include a DNA which can be identified by

carrying out hybridization at 65°C in the presence of 0.7-1.0 M NaCl using a filter on which a DNA prepared from colonies or plaques is immobilized, and then washing the filter with 0.1x to 2x SSC solution (the composition of 1x SSC contains 150 mM sodium chloride and 15 mM sodium citrate) at 65°C.

(0015)

The hybridization can be carried out in accordance with a known method described in, for example, *Molecular Cloning*, 2nd ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, *DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach*, 2nd ed., Oxford University (1995) or the like. Specific examples of the DNA which can be hybridized include a DNA having an identity of 60% or more, preferably 80% or more, and more preferably 95% or more, with the complementary sequence to the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 when calculated using above BLAST or the like.

(0016)

The transformant which produces the protein of the present invention having a β 1,3-galactosyltransferase activity can be obtained, e.g., by preparing a recombinant DNA through ligation of the DNA of the present invention to a vector DNA in accordance with the method described in *Molecular Cloning*, 2nd ed., and then transforming a host cell with the recombinant DNA in accordance with the method described in *Molecular Cloning*, 2nd ed.

(0017)

The present invention is explained below in more detail.

(1) Preparation of the DNA of the present invention

The DNA of the present invention is desirably prepared from a microorganism belonging to the genus *Streptococcus*. Examples of the microorganism belonging to the genus *Streptococcus* include *Streptococcus agalactiae*, such as *Streptococcus agalactiae* Type Ib and the like.

(0018)

The microorganism belonging to the genus *Streptococcus* is cultured by a known method (for example, the method described in *J. Bacteriol.*, 181: 5176 (1999)).

After culturing, chromosomal DNA of the microorganism is isolated and purified by a known method (for example, method described in *Current Protocols in Molecular Biology*).

A fragment containing the DNA of the present invention can be obtained by a hybridization method, PCR or the like using a synthetic DNA designed based on a nucleotide sequence among the capsular polysaccharide biosynthesis genes of *Streptococcus agalactiae* Type III or Type Ia.

(0019)

The vector to which the DNA is ligated may be any vector, such as a phage vector, a plasmid vector or the

like, so long as it can replicate autonomously in *Escherichia coli* K12. Specific examples include ZAP Express (manufactured by Stratagene, *Strategies*, 5: 58 (1992)), pBluescript II SK(+) (manufactured by Stratagene, *Nucleic Acids Res.*, 17: 9494 (1989)), λ zap II (manufactured by Stratagene), λ gt10 and λ gt11 (*DNA Cloning, A Practical Approach*, 1: 49 (1985)), λ TriplEx (manufactured by Clontech), λ ExCell (manufactured by Amersham Pharmacia Biotech), pUC18 (*Gene*, 33: 103 (1985)) and the like.

(0020)

Any microorganism belonging to *Escherichia coli* can be used for the host of the recombinant DNA obtained by ligating the DNA of the present invention to the above vector, so long as it is a microorganism belonging to *Escherichia coli*. Specific examples include *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (manufactured by Stratagene, *Strategies*, 5: 81 (1992)), *Escherichia coli* C600 (*Genetics*, 39: 440 (1954)), *Escherichia coli* Y1088 (*Science*, 222: 778 (1983)), *Escherichia coli* Y1090 (*Science*, 222: 778 (1983)), *Escherichia coli* NM522 (*J. Mol. Biol.*, 166: 1 (1983)), *Escherichia coli* K802 (*J. Mol. Biol.*, 16: 118 (1966)), *Escherichia coli* JM105 (*Gene*, 38: 275 (1985)) and the like.

(0021)

Any method can be used in the method for introducing the recombinant DNA, so long as it is a method for introducing DNA into the selected host cell. Examples

include a method using a calcium ion (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2110 (1972)), a protoplast (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 248394/88), an electroporation (*Nucleic Acid Res.*, 16: 6127 (1988)) and the like.

(0022)

The nucleotide sequence of the DNA of the present invention contained in the recombinant DNA can be determined by extracting the recombinant DNA from the thus obtained transformant. For the determination of the nucleotide sequence, a conventional method, such as the dideoxy method (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463 (1977)) or an apparatus for nucleotide sequence analysis, such as DNA Sequencer 373A (manufactured by Perkin-Elmer) or the like, can be used.

(0023)

The DNA of interest can also be prepared by chemical synthesis based on the thus determined nucleotide sequence using, for example, DNA Synthesizer 8905 Type manufactured by Perceptive Biosystems or the like.

Examples of transformant containing the thus obtained recombinant DNA include *Escherichia coli* JM109/pBBPJ containing a plasmid DNA having the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2.

(2) Preparation of the protein of the present invention.

The protein of the present invention can be produced by expressing the DNA of the present invention obtained by the method of (1) in a host cell, for example, as shown below, using a method described in *Molecular Cloning*, 2nd ed., *Current Protocols in Molecular Biology* or the like.

(0024)

When the DNA of the present invention is used, a DNA fragment of a suitable length containing a portion which encodes the protein of the present invention can be prepared, if necessary. In addition, productivity of the protein can be improved by substituting a nucleotide of the protein-coding portion of the nucleotide sequence so that it has the most suitable codons for the expression in the host.

The transformant which expresses the DNA of the present invention can be obtained by inserting the DNA into a downstream of the promoter of a suitable expression vector to thereby prepare a recombinant DNA, and introducing the recombinant DNA into a host cell suitable for the expression vector.

(0025)

Any bacteria, yeasts, animal cells, insect cells, plant cells, and the like can be used as the host cell so long as it can express the gene of interest.

Examples of the expression vector include those which can replicate autonomously in the above-described host cell or can be integrated into chromosome and have a promoter at such a position that the DNA of the present invention can be transcribed.

(0026)

When a procaryote cell, such as a bacterium or the like, is used as the host cell, it is preferred that the recombinant DNA containing the DNA of the present invention can replicate autonomously in the bacterium. It is also preferred that the recombinant vector contains a promoter, a ribosome binding sequence, the DNA of the present invention and a transcription termination sequence. A gene regulating the promoter may also be desirably contained therewith in operable combination.

(0027)

Examples of the expression vector include pHelix1 (manufactured by Roche Diagnostics), pKK223-3 (manufactured by Amersham Pharmacia Biotech), pSE280 (manufactured by Invitrogen), pGEMEX-1 (manufactured by Promega), pQE-8 (manufactured by QIAGEN), pET-3 (manufactured by Novagen), pKYP10 (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 110600/83), pKYP200 (*Agric. Biol. Chem.*, 48: 669 (1984)), pLSA1 (*Agric. Biol. Chem.*, 53: 277 (1989)), pGEL1 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4306 (1985)), pBluescript II SK(+) (manufactured by Stratagene), pTrs30 (prepared from

Escherichia coli JM109/pTrs30 (FERM BP-5407)), pTrs32 (prepared from *Escherichia coli* JM109/pTrs32 (FERM BP-5408)), pPAC31 (WO 98/12343), pUC19 (Gene, 33: 103 (1985)), pSTV28 (manufactured by Takara Shuzo), pUC118 (manufactured by Takara Shuzo), pPA1 (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 233798/88), and the like.

(0028)

Any promoter can be used so long as it can function in the host cell. Examples include promoters derived from *Escherichia coli*, phage and the like, such as *trp* promoter (*P_{trp}*), *lac* promoter (*P_{lac}*), *P_L* promoter, *P_R* promoter, *P_{SE}* promoter, etc., *SP01* promoter, *SP02* promoter, *penP* promoter and the like. Also, artificially designed and modified promoters, such as a promoter in which two *P_{trp}* are linked in tandem (*P_{trp}×2*), *tac* promoter, *lacT7* promoter *letI* promoter and the like, can be used.

(0029)

It is preferred to use a plasmid in which the space between Shine-Dalgarno sequence, which is the ribosome binding sequence, and the initiation codon is adjusted to an appropriate distance (for example, 6 to 18 base pairs).

The transcription termination sequence is not always necessary for the expression of the DNA of the present invention. However, it is preferred to provide a transcription terminating sequence just downstream of the structural gene.

(0030)

Examples of the procaryote cell include microorganisms belonging to the genera *Escherichia*, *Serratia*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* and the like. Specific examples include *Escherichia coli* XL1-Blue, *Escherichia coli* XL2-Blue, *Escherichia coli* DH1, *Escherichia coli* MC1000, *Escherichia coli* KY3276, *Escherichia coli* W1485, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* No. 49, *Escherichia coli* W3110, *Escherichia coli* NY49, *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Brevibacterium immariophilum* ATCC 14068, *Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Microbacterium ammoniaphilum* ATCC 15354, *Pseudomonas* sp. D-0110, *Streptococcus agalactiae* Type Ia, *Streptococcus agalactiae* Type Ib, *Streptococcus agalactiae* Type III, *Streptococcus pneumoniae* Type 14, and the like.

(0031)

With regard to the method for the introduction of the recombinant DNA, any method for introducing DNA into the above-described host cells, such as a method using a

calcium ion (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2110 (1972)), a protoplast (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 248394/88), an electroporation (*Nucleic Acids Res.*, 16: 6127 (1988)) and the like, can be used.

(0032)

When yeast is used as the host cell, examples of the expression vector include YEp13 (ATCC 37115), YEp24 (ATCC 37051), YCp50 (ATCC 37419), pHS19, pHS15, and the like.

Any promoter can be used so long as it can function in yeast. Examples include PHO5 promoter, PGK promoter, GAP promoter, ADH promoter, gal 1 promoter, gal 10 promoter, a heat shock polypeptide promoter, MF α 1 promoter, CUP 1 promoter and the like.

(0033)

Examples of the host cell include yeast strains belonging to the genera *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Trichosporon*, *Schwanniomyces*, *Pichia*, *Candida* and the like. Specific examples include *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Trichosporon pullulans*, *Schwanniomyces alluvius*, *Pichia pastoris*, *Candida utilis* and the like.

(0034)

With regard to the method for the introduction of the recombinant DNA, any method for introducing DNA into

yeast, such as an electroporation (*Methods. Enzymol.*, 194: 182 (1990)), a spheroplast method (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 1929 (1978)), a lithium acetate method (*J. Bacteriol.*, 153: 163 (1983)) and the like, can be used.

(0035)

When an animal cell is used as the host cell, examples of the expression vector include pcDNAI and pCDM8 (manufactured by Funakoshi), pAGE107 (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 22979/91), pAS3-3 (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 227075/90), pCDM8 (*Nature*, 329: 840 (1987)), pcDNAI/Amp (manufactured by Invitrogen), pREP4 (manufactured by Invitrogen), pAGE103 (*J. Biochem.*, 101: 1307 (1987)), pAGE210, pAMo, pAMoA and the like.

(0036)

Any promoter can be used so long as it can function in an animal cell. Examples include a promoter of IE (immediate early) gene of cytomegalovirus (CMV), an early promoter of SV40, a metallothionein promoter, a promoter of retrovirus, a heat shock promoter, SR α promoter, and the like. Also, the enhancer of the IE gene of human CMV can be used together with the promoter.

(0037)

Examples of the host cell include mouse myeloma cell, rat myeloma cell, mouse hybridoma cell, human Namalwa cell, Namalwa KJM-1 cell, human fetal kidney cell, human

leukemia cell, African grivet kidney cell, Chinese hamster ovary (CHO) cell HST5637 (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 299/88) and the like.

(0038)

Examples of the mouse myeloma cell include SP2/0, NS0 and the like. Examples of the rat myeloma cell include YB2/0 and the like. Examples of the human fetal kidney cell include HEK293 (ATCC: CRL-1573) and the like. Examples of the human leukemia cell include BALL-1 and the like. Examples of the African grivet kidney cell include COS-1, COS-7 and the like.

The method for introduction of the recombinant DNA into animal cells is not particularly limited, so long as it is the general method for introducing DNA into animal cells, such as an electroporation (*Cytotechnology*, 3: 133 (1990)), a calcium phosphate method (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 227075/90), a lipofection (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413 (1987)), the method described in *Virology*, 52: 456 (1973) and the like.

(0039)

When an insect cell is used as the host cell, the protein can be expressed by a known method described in, for example, *Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*, W.H. Freeman and Company, New York (1992), *Molecular Biology, A Laboratory Manual, Current Protocols*

in *Molecular Biology, Bio/Technology*, 6: 47 (1988) or the like.

(0040)

Specifically, a transfer vector containing the DNA to make it express and baculovirus are co-transfected into an insect cell to obtain a recombinant virus in a supernatant of the culture of its insect cell, and then an insect cell is infected with the resulting recombinant virus to express the protein.

Examples of the transfer vector used in the method include pVL1392, pVL1393 and pBlueBacIII (all manufactured by Invitrogen), and the like.

(0041)

Examples of the baculovirus include *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus which infects insects of the family *Barathra* and the like.

Examples of the insect cell include *Spodoptera frugiperda* ovary cell, *Trichoplusia ni* ovary cell, *Bombyx mori* ovary-derived culturing cell and the like.

(0042)

Examples of *Spodoptera frugiperda* ovary cells include Sf9 and Sf21 (*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*) and the like. Examples of *Trichoplusia ni* ovary cells include High 5 and BTI-TN-5B1-4 (manufactured by Invitrogen) and the like. Examples of the

cell line derived from silkworm ovary cell include *Bombyx mori* N4 and the like.

The methods for co-transfecting the above transfer vector and the above baculovirus for the preparation of the recombinant virus include a calcium phosphate method (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 227075/90), a lipofection (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7413 (1987)), and the like.

(0043)

When a plant cell is used as the host cell, examples of expression vector include Ti plasmid, a tobacco mosaic virus vector, and the like.

Any promoter can be used so long as it can function in a plant cell. Examples include 35S promoter of cauliflower mosaic virus (CaMV), rice actin 1 promoter, and the like.

(0044)

Examples of the host cells include plant cells and the like, such as tobacco, potato, tomato, carrot, soybean, rape, alfalfa, rice, wheat, barley, and the like.

The method for introducing the recombinant DNA is not particularly limited, so long as it is the general method for introducing DNA into a plant cell, such as the *Agrobacterium* method (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 140885/84, Japanese Published Unexamined Patent Application No. 70080/85, WO 94/00977), the

electroporation (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 251887/85), the particle gun method (Patents 2606856 and 2517813), and the like.

(0045)

The gene can be expressed as a secretory protein or a fusion protein and the like in accordance with the methods described in *Molecular Cloning*, 2nd ed., in addition to direct expression.

When expressed in yeast, an animal cell or an insect cell, a glycosylated protein can be obtained.

(0046)

The protein of the present invention can be produced by culturing the thus obtained transformant of the present invention in a medium to produce and accumulate the protein in the culture, and recovering the protein from the culture.

Culturing of the transformant of the present invention in a medium is carried out according to the conventional method as used in culturing of the host.

(0047)

As a medium for culturing the transformant obtained by using, as the host, prokaryote (such as *Escherichia coli* or the like) or eukaryote (such as yeast or the like), the medium may be either a natural medium or a synthetic medium, so long as it contains a carbon source, a nitrogen source, an inorganic salt and the like which can be assimilated by

the organism and the transformant can be cultured efficiently.

Examples of the carbon source which can be assimilated by the transformant include carbohydrates (for example, glucose, fructose, sucrose, molasses containing them, starch, starch hydrolysate, etc.), organic acids (for example, acetic acid, propionic acid, etc.), alcohols (for example, ethanol, propanol, etc.), and the like.

(0048)

Examples of the nitrogen source include ammonia, various ammonium salts of inorganic acids or organic acids (for example, ammonium chloride, ammonium sulfate, ammonium acetate, ammonium phosphate, etc.), other nitrogen-containing compounds, peptone, meat extract, yeast extract, corn steep liquor, casein hydrolysate, soybean meal and soybean meal hydrolysate, various fermented cells and hydrolysates thereof, and the like.

(0049)

Examples of the inorganic salt include potassium dihydrogen phosphate, dipotassium hydrogen phosphate, magnesium phosphate, magnesium sulfate, sodium chloride, ferrous sulfate, manganese sulfate, copper sulfate, calcium carbonate, and the like.

Culturing is usually carried out under aerobic conditions by shaking culture, submerged spinner culture under aeration or the like. The culturing temperature is

preferably from 15 to 40°C, and the culturing time is generally from 5 hours to 7 days. The pH of the medium is preferably maintained at 3.0 to 9.0 during culturing. The pH can be adjusted using an inorganic or organic acid, an alkali solution, urea, calcium carbonate, ammonia, or the like.

(0050)

Also, antibiotics such as ampicillin, tetracycline, and the like, can be added to the medium during culturing, if necessary.

When a microorganism transformed with an expression vector containing an inducible promoter is cultured, an inducer can be added to the medium, if necessary. For example, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) or the like can be added to the medium when a microorganism transformed with an expression vector containing *lac* promoter is cultured, or indoleacrylic acid or the like can be added thereto when a microorganism transformed with an expression vector containing *trp* promoter is cultured.

(0051)

Examples of the medium for culturing a transformant obtained using an animal cell as the host include generally used RPMI 1640 medium (*The Journal of the American Medical Association*, 199: 519 (1967)), Eagle's MEM (*Science*, 122: 501 (1952)), DMEM (*Virology*, 8: 396 (1959)), and 199 Medium (*Proceeding of the Society for the Biological*

Medicine, 73: 1 (1950)), as well as other media to which fetal calf serum or the like has been added to the above media and the like.

(0052)

Culturing is generally carried out under conditions at pH 6 to 8 and at 30 to 40°C for 1 to 7 days in the presence of 5% CO₂ or the like.

Furthermore, if desired, antibiotics such as kanamycin, penicillin, streptomycin and the like, can be added to the medium during culturing.

Examples of the medium for culturing a transformant obtained using an insect cell as the host include generally used TNM-FH medium (manufactured by Pharmingen), Sf-900 II SFM (manufactured by Life Technologies), ExCell 400 and ExCell 405 (both manufactured by JRH Biosciences), Grace's Insect Medium (*Nature*, 195: 788 (1962)) and the like.

(0053)

Culturing is generally carried out under conditions at pH 6 to 7 and at 25 to 30°C for 1 to 5 days or the like.

Furthermore, if desired, antibiotics such as gentamicin and the like, can be added to the medium during culturing.

A transformant obtained using a plant cell as the host cell can be used as the cell or after differentiating to a plant cell or organ. Examples of the medium used in culturing of the transformant include Murashige and Skoog

(MS) medium, White medium, media to which a plant hormone, such as auxin, cytokinine, or the like has been added, and the like.

(0054)

Culturing is carried out generally at a pH 5 to 9 and at 20 to 40°C for 3 to 60 days.

Also, antibiotics such as kanamycin, hygromycin and the like, can be added to the medium during culturing, if necessary.

As described above, the protein can be produced by culturing a transformant derived from a microorganism, animal cell or plant cell containing a recombinant DNA to which a DNA encoding the protein of the present invention has been inserted according to the general culturing method to produce and accumulate the protein, and recovering the protein from the culture.

(0055)

The method for producing the protein of the present invention includes a method of intracellular expression in a host cell, a method of extracellular secretion from a host cell, or a method of production on an outer membrane of the host cell. The method can be selected by changing the host cell employed or the structure of the protein produced.

When the protein of the present invention is produced in a host cell or on an outer membrane of the host

cell, the protein can be actively secreted extracellularly according to, for example, the method of Paulson et al. (*J. Biol. Chem.*, 264: 17619 (1989)), the method of Lowe et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 8227 (1989); *Genes Develop.*, 4: 1288 (1990)), or the methods described in Japanese Published Unexamined Patent Application Nos. 336963/93, 823021/94, and the like.

(0056)

Specifically, the protein of the present invention can be actively secreted extracellularly by expressing it in the form that a signal peptide has been added to the side of N-terminal of a protein containing an active site of the protein of the present invention according to the recombinant DNA technique.

(0057)

Furthermore, the amount produced can be increased using a gene amplification system, such as by use of a dihydrofolate reductase gene or the like according to the method described in Japanese Published Unexamined Patent Application No. 227075/90.

Moreover, the protein of the present invention can be produced by a transgenic animal (transgenic nonhuman animal) or plant (transgenic plant).

When the transformant is the nonhuman animal individual or plant individual, the protein of the present invention can be produced by breeding or cultivating it so

as to produce and accumulate the protein, and recovering the protein from the nonhuman animal individual or plant individual.

(0058)

Examples of the method for producing the protein of the present invention using the nonhuman animal individual include a method for producing the protein of the present invention in a nonhuman animal developed by introducing a gene according to known methods (*Am. J. Clin. Nutr.*, 63: 639S (1996), *Am. J. Clin. Nutr.*, 63: 627S (1996), *Bio/Technology*, 9: 830 (1991)).

In the nonhuman animal individual, the protein can be produced by breeding a transgenic nonhuman animal to which the DNA encoding the protein of the present invention has been introduced to produce and accumulate the protein in the animal, and recovering the protein from the animal. Examples of the production and accumulation place in the animal include milk (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 309192/88), egg and the like of the animal. Any promoter can be used, so long as it can function in the animal. Suitable examples include an α -casein promoter, a β -casein promoter, a β -lactoglobulin promoter, a whey acidic protein promoter, and the like, which are specific for mammary glandular cells.

(0059)

Examples of the method for producing the protein of the present invention using the plant individual include a method for producing the protein of the present invention by cultivating a transgenic plant to which the DNA encoding the protein of the present invention is introduced by a known method (*Tissue Culture*, 20 (1994), *Tissue Culture*, 21 (1994), *Trends in Biotechnol.*, 15: 45 (1997)) to produce and accumulate the protein in the plant, and recovering the protein from the plant.

(0060)

The protein produced by the transformant of the present invention can be isolated and purified using the general method for isolating and purifying an enzyme.

For example, when the protein of the present invention is expressed as a soluble product in the host cells, the cells are collected by centrifugation after culturing, suspended in an aqueous buffer, and disrupted using an ultrasonicator, a French press, a Manton Gaulin homogenizer, a Dynomill, or the like to obtain a cell-free extract.

(0061)

From the supernatant obtained by centrifuging the cell-free extract, a purified product can be obtained by the general method used for isolating and purifying an enzyme, for example, solvent extraction, salting-out using ammonium sulfate or the like, desalting, precipitation

using an organic solvent, anion exchange chromatography using a resin, such as diethylaminoethyl (DEAE)-Sephacrose, DIAION HPA-75 (manufactured by Mitsubishi Chemical) or the like, cation exchange chromatography using a resin, such as S-Sephacrose FF (manufactured by Pharmacia) or the like, hydrophobic chromatography using a resin, such as butyl sephacrose, phenyl sephacrose or the like, gel filtration using a molecular sieve, affinity chromatography, chromatofocusing, or electrophoresis, such as isoelectronic focusing or the like, alone or in combination thereof.

(0062)

When the protein is expressed as an inclusion body in the host cells, the cells are collected in the same manner, disrupted and centrifuged to recover the protein as the precipitate fraction. Next, the inclusion body of the protein is solubilized with a protein-denaturing agent.

The solubilized protein solution is diluted or dialyzed to lower the concentration of the protein denaturing agent in the solution. Thus, the normal tertiary structure of the protein is reconstituted. After the procedure, a purified product of the protein can be obtained by a purification/isolation method similar to the above.

(0063)

When the protein of the present invention or its glycosylated-derivative is secreted out of cells, the

protein or its derivative can be collected in the culture supernatant.

Namely, the culture supernatant is obtained by treating the culture medium in a treatment similar to the above, such as centrifugation or the like. Then a purified product can be obtained from the supernatant using a purification/isolation method similar to the above.

(0064)

Examples of the protein obtained by the above method include a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1.

Furthermore, a fusion protein of the protein of the present invention and other protein is produced, and can be purified using affinity chromatography using a substance having affinity to the fusion protein. For example, the protein of the present invention is produced as a fusion protein with protein A according to the method of Lowe et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 8227 (1989); *Genes Develop.*, 4: 1288 (1990)), or the method described in Japanese Published Unexamined Patent Application No. 336963/93 or 823021/94, and it can be purified by affinity chromatography using immunoglobulin G.

(0065)

Moreover, the protein of the present invention is produced as a fusion protein with Flag peptide, and the fusion protein can be purified by affinity chromatography

using an anti-Flag antibody (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86: 8227 (1989)). Further purification can be carried out by affinity chromatography using the antibody against the protein *per se*.

(0066)

Also, based on the information of the thus obtained protein, the protein of the present invention can be produced by a chemical synthesis method, such as Fmoc (fluorenylmethyloxycarbonyl) method, tBoc (t-butyloxycarbonyl) method, or the like. It can also be chemically synthesized using a peptide synthesizer manufactured by Advanced ChemTech, Perkin-Elmer, Pharmacia, Protein Technology Instrument, Synthecell-Vega, PerSeptive, Shimadzu Corporation, or the like.

(3) Preparation of galactose-containing carbohydrate

A galactose-containing carbohydrate can be produced in an aqueous medium using a culture of the transformant obtained by culturing described in (2) or a treated product of the culture as the enzyme source.

(0067)

Examples of the treated product of culture include a concentrated product of the culture, a dried product of the culture, cells obtained by centrifuging the culture, a dried product of the cells, a freeze-dried product of the cells, a surfactant-treated product of the cells, an ultrasonic-treated product of the cells, a mechanically

disrupted product of the cells, a solvent-treated product of the cells, an enzyme-treated product of the cells, a protein fraction of the cells, an immobilized product of the cells, an enzyme preparation obtained by extracting from the cell, and the like.

(0068)

The enzyme source for use in the production of a galactose-containing carbohydrate is used in a concentration of 1 mU/l to 1,000 U/l, preferably 10 mU/l to 100 U/l, when the activity capable of forming 1 μ mol of galactose-containing carbohydrate at 37°C in 1 minute is defined as 1 unit (U).

Examples of the aqueous medium for use in the production of a galactose-containing carbohydrate include water, buffer solutions (for example, phosphate buffer, carbonate buffer, acetate buffer, borate buffer, citrate buffer, tris bufrer, etc.), alcohols (for example, methanol, ethanol, etc.), esters (for example, ethyl acetate, etc.), ketones (for example, acetone, etc.), amides (for example, acetamide, etc.), and the like. Also, the culture of the microorganisms used as the enzyme source can be used as an aqueous medium.

(0069)

In producing a galactose-containing carbohydrate, a surfactant or an organic solvent may be added, if necessary. Any surfactant capable of accelerating the formation of a

galactose-containing carbohydrate may be used as the surfactant. Examples include nonionic surfactants (for example, polyoxyethylene octadecylamine (e.g., Nymeen S-215, manufactured by Nippon Oil & Fats), etc.), cationic surfactants (for example, cetyltrimethylammonium bromide, alkyl dimethyl benzylammonium chloride (e.g., Cation F2-40E, manufactured by Nippon Oil & Fats), etc.), anionic surfactants (for example, lauroyl sarcosinate, etc.), tertiary amines (for example, alkyl dimethylamine (e.g., Tertiary Amine FB, manufactured by Nippon Oil & Fats), etc.), and the like, which are used alone or as a mixture of two or more. The surfactant is used generally in a concentration of 0.1 to 50 g/l. Examples of the organic solvent include xylene, toluene, fatty acid alcohol, acetone, ethyl acetate, and the like, which are used in a concentration of generally 0.1 to 50 ml/l.

(0070)

The galactose-containing carbohydrate formation reaction is carried out in an aqueous medium having a pH 5 to 10, preferably 6 to 8, at 20 to 50°C for 1 to 96 hours. In this formation reaction, inorganic salts, such as MnCl_2 , MgCl_2 and the like, can be added, if necessary.

The amount of the galactose-containing carbohydrate produced in the aqueous medium can be determined, for example, using a glycosyl analyzer manufactured by Dionex (*Anal. Biochem.*, 189: 151 (1990)).

(0071)

The galactose-containing carbohydrate produced in the aqueous medium can be collected by the ordinary methods using activated carbon, ion exchange resins, and the like.

The present invention is explained based on the examples, but the scope of the present invention is not limited thereto.

(0072)

(Examples)

Example 1 Isolation of DNA containing β 1,3-galactosyltransferase gene:

(1) Cloning of capsular polysaccharide biosynthesis genes from *Streptococcus agalactiae* Type Ia (1)

Streptococcus agalactiae Type Ia was cultured by the method described in *J. Bacteriol.*, 181: 5176 (1999). After collecting the cells by centrifugation, chromosomal DNA of the microorganism was isolated and purified in accordance with the method described in *Current Protocols in Molecular Biology*.

(0073)

DNAs having the nucleotide sequences represented by SEQ ID NOs:4 and 5 which had been designed based on the nucleotide sequence around the *cpsD* gene which is one of the capsular polysaccharide biosynthesis genes of *Streptococcus agalactiae* Type III (*Mol. Microbiol.*, 8: 843 (1993)) were synthesized using a DNA synthesizer Model 8905

manufactured by Perceptive Biosystems. Using these synthetic DNAs as a primer set, PCR was carried out using the chromosomal DNA of *Streptococcus agalactiae* Type Ia as the template. The PCR was carried out using 40 µl of a reaction solution containing 0.1 µg of the chromosomal DNA, 0.5 µmol/l each primer, 2.5 units of TaKaRa LA Taq polymerase (manufactured by Takara Shuzo), 4 µl of a buffer solution for TaKaRa LA Taq polymerase and 200 µmol/l each deoxyNTP and repeating a reaction step consisting of 1 minute at 94°C, 2 minutes at 42°C and 3 minutes at 72°C 30 times. A probe was prepared by labeling the thus amplified fragment using Random Primer DNA Labeling Kit (manufactured by Takara Shuzo).

(0074)

Fragments obtained by digesting the chromosomal DNA of *Streptococcus agalactiae* Type Ia with a restriction enzyme *EcoRI* were ligated to pBluescript II SK(+) to prepare recombinant DNAs, and a library was prepared by transforming *E. coli* JM109 with these recombinant DNAs.

Using the above probe and library, colony hybridization was carried out according to the method known by persons having ordinary skill in the art to obtain a strain of clone showing a strong signal. A plasmid contained in this strain was named pBA101 and its structure was analyzed to find that it was a structure in which a 3.5 kb fragment derived from the chromosomal DNA of

Streptococcus agalactiae Type Ia was inserted into pBluescript II SK(+). The nucleotide sequence of the DNA was determined according to the method known by persons having ordinary skill in the art, and as a result, the three genes named *cpsIaF*, *cpsIaG* and *cpsIaH*, and a part of a gene named *cpsIaE* described in *J. Bacteriol.*, 181: 5176 (1999) were found in the DNA, so that it was confirmed that the DNA contains a part of the capsular polysaccharide biosynthesis genes. Also, as a result of homology search, it was confirmed that the *cpsIaE* gene and the *cpsIaG* gene had high homology with the glucosyltransferase gene and with the β 1,4-galactosyltransferase gene, respectively (Fig. 1).

(2) Cloning of capsular polysaccharide biosynthesis gene from *Streptococcus agalactiae* Type Ia (2)

The 3.5 kb fragment of *Streptococcus agalactiae* Type Ia, which had been inserted into the plasmid pBA101 obtained in (1) of Example 1, was labeled using Random Primer DNA Labeling Kit (manufactured by Takara Shuzo) to prepare a probe.

(0075)

Fragments obtained by digesting the chromosomal DNA of *Streptococcus agalactiae* Type Ia with a restriction enzyme *Bgl*III were ligated to pBluescript II SK(+) to prepare recombinant DNAs, and a library was prepared by transforming *E. coli* JM109 with these recombinant DNAs.

Using the above probe and library, colony hybridization was carried out so as to obtain a strain of clone showing a strong signal. A plasmid contained in this strain was named pBA103 and its structure was analyzed to find that it was a structure in which a 3.1 kb DNA derived from the chromosomal DNA of *Streptococcus agalactiae* Type Ia was inserted into pBluescript II SK(+). When the nucleotide sequence of the 3.1 kb DNA was determined according to the method known by persons having ordinary skill in the art, genes named *cpsIaI* and *cpsIaJ* and a part of the *cpsIaH* gene were found in the DNA, and it was confirmed that the DNA contained in pBA103 was a DNA adjacent to the DNA contained in pBA101 on the chromosomal DNA and that pBA103 is also a plasmid which contains a part of the DNA of the capsular polysaccharide biosynthesis genes. As a result of homology search, it was confirmed that the *cpsIaI* gene and the *cpsIaJ* gene have high homology with the β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase gene and the β 1,4-galactosyltransferase gene, respectively (Fig. 1, *J. Bacteriol.*, 181: 5176 (1999)).

(3) Isolation of DNA containing β 1,3-galactosyltransferase gene from *Streptococcus agalactiae* Type Ib

The 3.1 kb fragment of *Streptococcus agalactiae* Type Ia, which had been inserted into the plasmid pBA103 obtained in (2) of Example 1, was labeled using Random

Primer DNA Labeling Kit (manufactured by Takara Shuzo) to prepare a probe.

(0076)

Streptococcus agalactiae Type Ib was cultured by the method described in *J. Bacteriol.*, 181: 5176 (1999). After collecting the cells by centrifugation, chromosomal DNA of the microorganism was isolated and purified in accordance with the method described in *Current Protocols in Molecular Biology*.

Fragments obtained by digesting the chromosomal DNA of *Streptococcus agalactiae* Type Ib with a restriction enzyme *Bgl*II were introduced into pBluescript II SK(+) and transformed into *E. coli* JM109 to prepare a library.

(0077)

Using the above probe and library, colony hybridization was carried out to obtain two cloned strains showing a strong signal. Plasmids contained in these strains were named pBB102 and pBB103, respectively, and their structures were analyzed to find that they were structures in which 5.5 and 1.4 kb fragments derived from the chromosomal DNA of *Streptococcus agalactiae* Type Ib were inserted into pBluescript II SK(+), respectively (Fig. 1).

(0078)

When the nucleotide sequences of these two DNAs were determined according to the method known by persons

having ordinary skill in the art, it was determined that these two DNAs were present by adjacent to each other on the chromosomal DNA and having the continued nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:3. It was revealed that genes named *cpsIbE*, *cpsIbF*, *cpsIbG*, *cpsIbH*, *cpsIbI* and *cpsIbJ* are present in the DNA having the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:3. As a result of homology search, the *cpsIbE* gene showed high homology with the *cpsIaE* gene and the glucosyltransferase gene, the *cpsIbG* gene with the *cpsIaG* gene and the β 1,4-galactosyltransferase gene, and the *cpsIbI* gene with the *cpsIaI* gene and the β 1,3-*N*-acetylgalactosaminyltransferase gene. Accordingly, it was confirmed that the DNA having the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:3 contains a part of the capsular polysaccharide biosynthesis genes in *Streptococcus agalactiae* Type Ib.

(0079)

Also, it was considered that the *cpsIbJ* gene is a gene comprising a DNA encoding a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity because the protein encoded by the *cpsIbJ* gene having the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 has a preserved sequence of a glycosyltransferase but its homology with the *cpsIaJ* gene is low, a *cpsIaJ* gene product takes a role in transferring galactose in the capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus agalactiae* Type Ia (*J. Bacteriol.*, 181: 5176

(1999)), and the linkages of galactose of capsular polysaccharide in *Streptococcus agalactiae* Type Ia and *Streptococcus agalactiae* Type Ib are different, which are β 1,4 and β 1,3, respectively (*J. Bacteriol.*, 181: 5176 (1999)). The amino acid sequence of the protein encoded by this DNA is shown in SEQ ID NO:1.

Example 2 Construction of a strain expressing β 1,3-galactosyltransferase gene:

A DNA containing the galactosyltransferase gene obtained in (3) of Example 1 was amplified by the following method using DNAs having the nucleotide sequences represented by SEQ ID NOs:6 and 7 synthesized using DNA Synthesizer Model 8905 manufactured by Perceptive Biosystems.

(0080)

PCR was carried out using these synthesized DNAs as a primer set and the *Streptococcus agalactiae* Type Ib chromosomal DNA as the template. Using 40 μ l of a reaction solution containing 0.1 μ g of the chromosomal DNA, 0.5 μ mol/l each primer, 2.5 units of TaKaRa LA Taq polymerase (manufactured by Takara Shuzo), 4 μ l of a buffer solution for TaKaRa LA Taq polymerase and 200 μ mol/l each deoxyNTP, PCR was carried out by repeating a step of 94°C for 1 minute, 42°C for 2 minutes and 72°C for 3 minutes 30 times.

(0081)

After confirming amplification of the fragment of interest by subjecting 1/10 volume of the reaction solution to agarose gel electrophoresis, the amplified fragment was recovered from the remaining reaction solution using GeneClean II Kit (manufactured by Bio 101) and then dissolved in TE buffer (10 mmol/l Tris-HCl and 1 mmol/l EDTA (pH 8.0)) to obtain 20 µl of the DNA solution.

Using 5 µl of the dissolved solution, the DNA was digested with restriction enzymes NotI and XhoI, the resulting DNAs were separated using agarose gel electrophoresis and then a DNA of 2.0 kb was recovered using GeneClean II Kit.

(0082)

After 0.2 µg of pBluescript II SK(+) DNA was digested with restriction enzymes NotI and XhoI, the resulting DNAs were separated by agarose gel electrophoresis and then a DNA of 3.0 kb was recovered using GeneClean II Kit.

Using a ligation kit, the 2.0 kb and 3.0 kb fragments were ligated at 16°C for 16 hours.

(0083)

Using the ligation reaction solution, *E. coli* JM109 was transformed in accordance with the method known by persons having ordinary skill in the art, and the transformants were spread on LB agar medium (10 g/l Bacto Tryptone (manufactured by Difco), 10 g/l Yeast Extract

(manufactured by Difco), 5 g/l sodium chloride, 15 g/l agar) containing 50 µg/ml ampicillin, followed by culturing overnight at 37°C.

By extracting plasmid from the thus grown transformant colonies in accordance with the method known by persons having ordinary skill in the art, an expression plasmid pBBPIJ was obtained. The structure of this plasmid was confirmed by restriction enzyme digestion (Fig. 2).

(0084)

In the same manner, PCR was carried out using DNAs having the nucleotide sequences represented by SEQ ID NOs:7 and 8 synthesized using DNA Synthesizer Model 8905 manufactured by Perceptive Biosystems as a primer set and the *Streptococcus agalactiae* type Ib chromosomal DNA as the template.

After confirming amplification of the fragment of interest by subjecting 1/10 volume of the reaction solution to agarose gel electrophoresis, the amplified fragment was recovered from the remaining reaction solution using GeneClean II Kit (manufactured by Bio 101) to obtain 20 µl TE solution of the DNA.

(0085)

Using 5 µl of the solution, the DNA was digested with restriction enzymes *EcoRI* and *XhoI*, the resulting DNAs were separated by agarose gel electrophoresis and then a DNA of 1.0 kb was recovered using GeneClean II Kit.

After 0.2 µg of pBluescript II SK(+) DNA was digested with restriction enzymes *EcoRI* and *XhoI*, the resulting DNAs were separated by agarose gel electrophoresis and then a DNA of 3.0 kb was recovered using GeneClean II Kit.

(0086)

Using a ligation kit, the 1.0 kb and 3.0 kb fragments were ligated at 16°C for 16 hours.

Using the ligation reaction solution, *E. coli* JM109 was transformed in accordance with the method known by persons having ordinary skill in the art, and the transformants were spread on LB agar medium containing 50 µg/ml ampicillin, followed by culturing overnight at 37°C.

(0087)

By extracting plasmid from the thus grown transformant colonies in accordance with the method known by persons having ordinary skill in the art, an expression plasmid pBBPJ was obtained. The structure of this plasmid was confirmed by restriction enzyme digestion (Fig. 2).

Escherichia coli JM109/pBBPJ having the plasmid pBBPJ containing a DNA encoding a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity derived from *Streptococcus agalactiae* Type Ib has been deposited as FERM BP-7400 on December 21, 2000 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi,

Ibaraki-ken, 305-8566 Japan) (present name and address: International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Japan)).

Example 3 Production of lacto-*N*-tetraose:

Each of the *Escherichia coli* JM109/pBBPIJ and JM109/pBBPJ obtained in Example 2 was inoculated into a test tube charged with 8 ml of LB medium containing 50 µg/ml ampicillin respectively, followed by culturing at 37°C for 17 hours. The culture was inoculated at 1% into a test tube charged with 8 ml of LB medium containing 50 µg/ml ampicillin respectively, followed by culturing at 37°C for 5 hours, and then IPTG was added thereto to give a concentration of 1 mmol/l. Two hours after additional culturing, wet cells were obtained by centrifugation. A membrane fraction was prepared from the wet cells in accordance with the method known by persons having ordinary skill in the art (*J. Biol. Chem.*, 272: 19502 (1997), *Mol. Microbiol.*, 26: 197 (1997)). Since this membrane fraction can be stored at -80°C, if necessary, it was able to use it by thawing prior to use.

(0088)

Lacto-*N*-triose II to be used as the acceptor carbohydrate was prepared by allowing lacto-*N*-neotetraose (manufactured by Sigma) to react with β-galactosidase

(manufactured by Seikagaku Corporation), completely removing the non-reducing terminal galactose and then inactivating the β -galactosidase activity by heat treatment at 100°C for 5 minutes.

The reaction was carried out at 37°C for 72 hours in 0.1 ml of a reaction solution containing the JM109/pBBPIJ membrane fraction (200 μ g/ml), 50 mmol/l citrate buffer (pH 7.0), 5 mmol/l $MgCl_2$, 10 mmol/l lacto-*N*-triose II and 5 mmol/l UDP-galactose.

(0089)

After completion of the reaction, the reaction product was analyzed using a High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection system manufactured by Dionex (DX-500) under the following analyzing conditions to confirm that 0.2 mmol/l lacto-*N*-tetraose was produced and accumulated in the reaction solution.

In the same manner, it was confirmed that 0.05 mmol/l lacto-*N*-tetraose was produced and accumulated when a JM109/pBBPJ membrane fraction was used.

Analyzing conditions:

Column: CarboPAC PA10
Eluent: A; H_2O , B; 500 mmol/l NaOH
Gradient: 10 to 70% B in 20 min
Detector: Pulsed amperometric detector

(0090)

(Effect of the invention)

The present invention provides a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity derived from a microorganism having an activity of transferring galactose to N-acetylglucosamine with β 1,3-linkage. A galactose-containing carbohydrate can be efficiently produced by using the enzyme.

(0091)

(Free text of sequence listing)

SEQ ID NO:4: Synthetic DNA

SEQ ID NO:5: Synthetic DNA

SEQ ID NO:6: Synthetic DNA

SEQ ID NO:7: Synthetic DNA

SEQ ID NO:8: Synthetic DNA

(0092)

(Sequence listing)

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Beta 1,3-galactosyltransferase and a DNA coding for said enzyme

<130> 11328

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211>

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae Type Ib

<400> 1

Met Asn Tyr Ser Ile Ile Met Ser Val Tyr Asn Glu Pro Leu Asn Tyr
1 5 10 15

Val Arg Asp Ser Val Glu Ser Ile Leu Asn Gln Thr Leu Thr Asp Phe
20 25 30

Glu Phe Ile Ile Val Ile Asp Asn Pro Ser Arg Gly Asp Leu Lys Gln
35 40 45

Phe Leu Thr Glu Tyr Ser Val Val Asp Asn Arg Ile Lys Ile Leu Leu
50 55 60

Asn Glu Glu Asn Ile Gly Leu Ala Ser Ser Leu Asn Lys Ala Val Lys
65 70 75 80

Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Ile Phe Arg Met Asp Ala Asp Asp Ile Ser
85 90 95

Tyr Pro Ser Arg Phe Asp Lys Gln Ile Arg Phe Met Glu Glu Asn Ser
100 105 110

Leu Asp Phe Ser Ala Thr Leu Ile Glu Leu Ile Asp Gln Lys Gly Asn
115 120 125

Leu Val Tyr Lys Lys Gln Arg Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Leu Thr Asn Asp
130 135 140

Ile Arg Lys Met Leu Leu Asn Arg Ser Ile Leu Ala His Pro Thr Trp
145 150 155 160

Cys Val Lys Lys Lys Val Phe Asp Lys Leu Met Gly Tyr Arg Asp Leu
165 170 175

Val Pro Val Glu Asp Tyr Asp Phe Ala Ile Arg Gly Ala Leu Ala Asp
180 185 190

Phe Lys Ile Gly Leu Leu Asn Lys Val Leu Leu Gln Tyr Arg Leu Asn
195 200 205

Glu Asn Gly Ile Ser Gln Thr Asn Lys Phe Lys Gln Tyr Ile Tyr Ser
210 215 220

Ala Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Lys Glu Lys Ser Tyr Ile Asp Ile Thr

225		230		235		240
Lys Ile Thr Asn Tyr Phe Gln Glu Tyr Val Ile Lys Lys Arg Tyr Thr						
	245		250		255	
Gln Gln Glu Leu Ser Lys Tyr Phe Glu Leu Lys Ser Thr Pro Ser Ile						
	260		265		270	
Thr Ile Arg Lys Leu Tyr Ile Cys Leu Tyr Leu Tyr Phe Lys Ser Pro						
	275		280		285	
Leu Val Arg Arg Leu Leu Ile Asn Asp Ile Asn Ile Leu Val Leu Lys						
	290		295		300	
Leu Phe Gly Gly Glu Lys Gln Ser Asp						
305		310		313		

<210> 2

<211>

<212> DNA

<213> Streptococcus agalactiae Type Ib

<400> 2

atg aat tat agt atc att atg tcg gta tat aat gag cct tta aat tat	48
Met Asn Tyr Ser Ile Ile Met Ser Val Tyr Asn Glu Pro Leu Asn Tyr	
1 5 10 15	
gtg aga gat tca gta gaa tct ata tta aat caa acg ctt act gat ttt	96
Val Arg Asp Ser Val Glu Ser Ile Leu Asn Gln Thr Leu Thr Asp Phe	
20 25 30	
gag ttc ata att gtc att gat aat cca agt aga ggt gat tta aag caa	144
Glu Phe Ile Ile Val Ile Asp Asn Pro Ser Arg Gly Asp Leu Lys Gln	
35 40 45	
ttc tta aca gaa tat tca gtt gta gat aat aga ata aaa atc ttg ctt	192
Phe Leu Thr Glu Tyr Ser Val Val Asp Asn Arg Ile Lys Ile Leu Leu	
50 55 60	
aat gaa gaa aat att ggt tta gca tca agt ttg aac aaa gcg gtg aaa	240
Asn Glu Glu Asn Ile Gly Leu Ala Ser Ser Leu Asn Lys Ala Val Lys	
65 70 75 80	
att tct aag gga gaa tat att ttt aga atg gat gct gat gat att tca	288
Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Ile Phe Arg Met Asp Ala Asp Asp Ile Ser	
85 90 95	

tat cca agt aga ttt gat aag caa att cgt ttt atg gag gaa aat tca	336
Tyr Pro Ser Arg Phe Asp Lys Gln Ile Arg Phe Met Glu Glu Asn Ser	
100 105 110	
ttg gat ttc tca gca act cta ata gaa ttg ata gac caa aaa gga aat	384
Leu Asp Phe Ser Ala Thr Leu Ile Glu Leu Ile Asp Gln Lys Gly Asn	
115 120 125	
tta gta tat aaa caa cga gaa agt aat aaa ata tac tta act aat gat	432
Leu Val Tyr Lys Gln Arg Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Leu Thr Asn Asp	
130 135 140	
ata cgg aag atg tta ttg aat aga tct ata ctt gcc cac cca acg tgg	480
Ile Arg Lys Met Leu Leu Asn Arg Ser Ile Leu Ala His Pro Thr Trp	
145 150 155 160	
tgc gta aaa aag aaa gtt ttc gat aag tta atg gga tat aga gat tta	528
Cys Val Lys Lys Lys Val Phe Asp Lys Leu Met Gly Tyr Arg Asp Leu	
165 170 175	
gta cct gtt gaa gat tat gat ttt gca ata aga gga gct ctg gct gat	576
Val Pro Val Glu Asp Tyr Asp Phe Ala Ile Arg Gly Ala Leu Ala Asp	
180 185 190	
ttc aaa atc ggc tta ctc aat aaa gta ctt tta cag tat aga tta aac	624
Phe Lys Ile Gly Leu Leu Asn Lys Val Leu Leu Gln Tyr Arg Leu Asn	
195 200 205	
gag aat gga ata tca caa acc aat aag ttt aag caa tat att tac tca	672
Glu Asn Gly Ile Ser Gln Thr Asn Lys Phe Lys Gln Tyr Ile Tyr Ser	
210 215 220	
gct att tta caa gat ttt tat aaa gaa aaa tct tat att gat atc aca	720
Ala Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Lys Glu Lys Ser Tyr Ile Asp Ile Thr	
225 230 235 240	
aaa att act aat tac ttt caa gag tat gtg ata aag aaa cgc tat act	768
Lys Ile Thr Asn Tyr Phe Gln Glu Tyr Val Ile Lys Lys Arg Tyr Thr	
245 250 255	
cag caa gag ctc tct aaa tat ttt gag cta aaa tct acc cct agt att	816
Gln Gln Glu Leu Ser Lys Tyr Phe Glu Leu Lys Ser Thr Pro Ser Ile	
260 265 270	
act att aga aaa cta tat att tgt tta tat tta tac ttt aag tct ccc	864
Thr Ile Arg Lys Leu Tyr Ile Cys Leu Tyr Leu Tyr Phe Lys Ser Pro	

275	280	285	
ttg gtt agg agg tta tta ata aat gat att aat att tta gta ctg aaa	912		
Leu Val Arg Arg Leu Leu Ile Asn Asp Ile Asn Ile Leu Val Leu Lys			
290	295	300	
ttg ttt gga gga gag aaa caa agt gac	939		
Leu Phe Gly Gly Glu Lys Gln Ser Asp			
305	310		

<210> 3
 <211> 6865
 <212> DNA
 <213> Streptococcus agalactiae type Ib

<220>
 <221> CDS
 <222> (617)..(1789)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1816)..(2262)

<220>
 <221> CDS
 <222> (2265)..(2744)

<220>
 <221> CDS
 <222> (2843)..(3979)

<220>
 <221> CDS
 <222> (3982)..(4953)

<220>
 <221> CDS
 <222> (5009)..(5947)

<400> 3
 agatcttgga gatattatct gtgaaaccaa tgttcctaga ctgatggtcg ttccttcagg 60
 gaaagtacca ccaaatacaa cagcattact tcagaacgct tattttaata agatgattga 120
 agctattaaa aatatatttg attatattat catcgatact ccacctattg gtttagttgt 180

tgaigccgca ataatcgcta atgcttgcca tggttttatt ttagtaaccc aagcaggtag 240
 aataaaacgt aattatgttg aaaaagcaaa agaacagatg gaacaaagtg gttcaaagtt 300
 cttaggtatt attcctaata aagttaatga atctgttgct acttacggcg attatggaaa 360
 ttacggaaaa agggatagaa aaaggaagta aggggctctt gtattgaaag aaaaagaaaa 420
 tatacaaaag attattatag cgatgattca aaccgttggtg gtttattttt ctgcaagttt 480
 gacattaaca ttaattactc ccaactttaa aagcaataaa gatttattgt ttgttctatt 540
 gatacattat attgtctttt atctttctga tttttacaga gacttttggg gtcgtggcta 600
 tcttgaagag tttaaa atg gta ttg aaa tac agc ttt tac tat att ttc ata 652
 Met Val Leu Lys Tyr Ser Phe Tyr Tyr Ile Phe Ile
 1 5 10
 tca agt tca tta ttt ttt att tct aaa aac tct ttt aca acg aca cga 700
 Ser Ser Ser Leu Phe Phe Ile Ser Lys Asn Ser Phe Thr Thr Thr Arg
 15 20 25
 ctt tcc ttt ttt act ttt att gct atg aat tcg att tta tta tat cta 748
 Leu Ser Phe Phe Thr Phe Ile Ala Met Asn Ser Ile Leu Leu Tyr Leu
 30 35 40
 ttg aat tca ttt tta aaa tat tat cga aaa tat tct tac gct aag ttt 796
 Leu Asn Ser Phe Leu Lys Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ser Tyr Ala Lys Phe
 45 50 55 60
 tca cga gat acc aaa gtt gtt ttg ata acg aat aag gat tct tta tca 844
 Ser Arg Asp Thr Lys Val Val Leu Ile Thr Asn Lys Asp Ser Leu Ser
 65 70 75
 aaa atg acc ttt agg aat aaa tac gac cat aat tat atc gct gtc tgt 892
 Lys Met Thr Phe Arg Asn Lys Tyr Asp His Asn Tyr Ile Ala Val Cys
 80 85 90
 atc ttg gat tcc tct gaa aag gat tgt tat gat ttg aaa cat aac tcg 940
 Ile Leu Asp Ser Ser Glu Lys Asp Cys Tyr Asp Leu Lys His Asn Ser
 95 100 105
 tta agg ata ata aac aaa gat gct ctt act tca gag tta acc tgc tta 988
 Leu Arg Ile Ile Asn Lys Asp Ala Leu Thr Ser Glu Leu Thr Cys Leu
 110 115 120

Phe Tyr Asn Val Leu Lys Gly Asp Met Ser Leu Val Gly Thr Arg Pro	
305 310 315	
ccc aca gtt gat gaa tat gaa aag tat aat tca acg cag aag cga cgc	1612
Pro Thr Val Asp Glu Tyr Glu Lys Tyr Asn Ser Thr Gln Lys Arg Arg	
320 325 330	
ctt agt ttt aag cca gga atc act ggt ttg tgg caa ata tct ggt aga	1660
Leu Ser Phe Lys Pro Gly Ile Thr Gly Leu Trp Gln Ile Ser Gly Arg	
335 340 345	
aat aat att act gat ttt gat gaa atc gta aag tta gat gtt caa tat	1708
Asn Asn Ile Thr Asp Phe Asp Glu Ile Val Lys Leu Asp Val Gln Tyr	
350 355 360	
atc aat gaa tgg tct att tgg tca gat att aag att att ctc cta acg	1756
Ile Asn Glu Trp Ser Ile Trp Ser Asp Ile Lys Ile Ile Leu Leu Thr	
365 370 375 380	
cta aag gta gtt tta ctc ggg aca gga gct aag taaagtaag gtttgaaagg	1809
Leu Lys Val Val Leu Leu Gly Thr Gly Ala Lys	
385 390	
aatata atg aaa att tgt ctg gtt ggt tca agt ggt ggt cac cta gca	1857
Met Lys Ile Cys Leu Val Gly Ser Ser Gly Gly His Leu Ala	
395 400 405	
cac ttg aac ctt ttg aaa ccc att tgg gaa aaa gaa gat agg ttt tgg	1905
His Leu Asn Leu Leu Lys Pro Ile Trp Glu Lys Glu Asp Arg Phe Trp	
410 415 420	
gta act ttt gat aaa gaa gat gct agg agt att cta aga gaa gag att	1953
Val Thr Phe Asp Lys Glu Asp Ala Arg Ser Ile Leu Arg Glu Glu Ile	
425 430 435	
gta tat cat tgc ttc ttt cca aca aac cgt aat gtc aaa aac ttg gta	2001
Val Tyr His Cys Phe Phe Pro Thr Asn Arg Asn Val Lys Asn Leu Val	
440 445 450	
aaa aat act att cta gct ttt aag gtc ctt aga aaa gaa aga cca gat	2049
Lys Asn Thr Ile Leu Ala Phe Lys Val Leu Arg Lys Glu Arg Pro Asp	
455 460 465	
gtt atc ata tca tct ggt gcc gct gta gca gta cca ttc ttt tat att	2097
Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Ala Val Ala Val Pro Phe Phe Tyr Ile	
470 475 480 485	

ggt aag tta ttt ggc tgt aag acc gtt tat ata gag gtt ttc gac agg	2145
Gly Lys Leu Phe Gly Cys Lys Thr Val Tyr Ile Glu Val Phe Asp Arg	
490 495 500	
ata gat aaa cca act ttg aca gga aaa tta gtg tat cct gta aca gat	2193
Ile Asp Lys Pro Thr Leu Thr Gly Lys Leu Val Tyr Pro Val Thr Asp	
505 510 515	
aaa ttt att gtt cag tgg gaa gaa atg aaa aaa gtt tat cct aag gca	2241
Lys Phe Ile Val Gln Trp Glu Glu Met Lys Lys Val Tyr Pro Lys Ala	
520 525 530	
att aat tta gga gga att ttt ta atg att ttt gtc aca gta ggg aca	2288
Ile Asn Leu Gly Gly Ile Phe Met Ile Phe Val Thr Val Gly Thr	
535 540 545	
cat gaa cag cag ttc aac cgt ctt att aaa gaa gtt gat aga tta aaa	2336
His Glu Gln Gln Phe Asn Arg Leu Ile Lys Glu Val Asp Arg Leu Lys	
550 555 560	
ggg aca ggt gct att gat caa gaa gtg ttc att caa acg ggt tac tca	2384
Gly Thr Gly Ala Ile Asp Gln Glu Val Phe Ile Gln Thr Gly Tyr Ser	
565 570 575 580	
gac ttt gaa cct cag aat tgt cag tgg tca aaa ttt ctc tca tat gat	2432
Asp Phe Glu Pro Gln Asn Cys Gln Trp Ser Lys Phe Leu Ser Tyr Asp	
585 590 595	
gat atg aac tct tac atg aaa gaa gct gag att gtt atc aca cac ggc	2480
Asp Met Asn Ser Tyr Met Lys Glu Ala Glu Ile Val Ile Thr His Gly	
600 605 610	
ggt cca gca acg ttt atg aat gca gtt tct aaa ggg aaa aaa act att	2528
Gly Pro Ala Thr Phe Met Asn Ala Val Ser Lys Gly Lys Lys Thr Ile	
615 620 625	
gtg gtt cct aga caa gaa cag ttt gga gag cat gtg aat aat cat cag	2576
Val Val Pro Arg Gln Glu Gln Phe Gly Glu His Val Asn Asn His Gln	
630 635 640	
gtg gat ttt ttg aaa gag tta ttc ttg aaa tat gag tta gat tat att	2624
Val Asp Phe Leu Lys Glu Leu Phe Leu Lys Tyr Glu Leu Asp Tyr Ile	
645 650 655 660	
ttg aat atc agt gaa tta gag aat att att aag gaa aaa aat ata tct	2672

Leu Asn Ile Ser Glu Leu Glu Asn Ile Ile Lys Glu Lys Asn Ile Ser
 665 670 675
 act agt aaa gta ata tca caa aac aat gat ttt tgt tcc tct ttc aaa 2720
 Thr Ser Lys Val Ile Ser Gln Asn Asn Asp Phe Cys Ser Ser Phe Lys
 680 685 690
 aat gaa ctt tct aaa cta ttt gaa taaatatatt ttgttgaga aaaaaattga 2774
 Asn Glu Leu Ser Lys Leu Phe Glu
 695 700
 aattaactat caatccaaag tatttgtaa taggaggaat tttcgcttta accctatattt 2834
 caaagcca atg caa ctt ttg tta ctt tta gca tta ata gtt tta ctt att 2884
 Met Gln Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Ile Val Leu Leu Ile
 705 710
 tgt agt agt tat aat gaa aaa atg aaa ttt tta aat atg gct gaa att 2932
 Cys Ser Ser Tyr Asn Glu Lys Met Lys Phe Leu Asn Met Ala Glu Ile
 715 720 725 730
 ttt ttc att gta ttt tat atg gtt tat tta gta tca ata gta tta aat 2980
 Phe Phe Ile Val Phe Tyr Met Val Tyr Leu Val Ser Ile Val Leu Asn
 735 740 745
 tcg tta ttt aga agt cca gaa ttt cat aga gtc att gct gca ttc aat 3028
 Ser Leu Phe Arg Ser Pro Glu Phe His Arg Val Ile Ala Ala Phe Asn
 750 755 760
 tca ctg gca gta ggg gtt gtg tcc tta tta ttt tac cat tac tat aag 3076
 Ser Leu Ala Val Gly Val Val Ser Leu Leu Phe Tyr His Tyr Tyr Lys
 765 770 775
 aat act aat att gaa tta aca aaa ttg cta aaa tca ttt ttg ttt aat 3124
 Asn Thr Asn Ile Glu Leu Thr Lys Leu Leu Lys Ser Phe Leu Phe Asn
 780 785 790
 gca att att ttg ttt tgt tta gga ttt cta tat tat tat gcc ata tat 3172
 Ala Ile Ile Leu Phe Cys Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Tyr Ala Ile Tyr
 795 800 805 810
 ttt gat gta gag aat gta agt ctt ttt gga aga aat tta att gga tca 3220
 Phe Asp Val Glu Asn Val Ser Leu Phe Gly Arg Asn Leu Ile Gly Ser
 815 820 825
 gat tgg ata aat ggg atg cat acg cag aga gca atg gct ttc ttt gaa 3268

Asp Trp Ile Asn Gly Met His Thr Gln Arg Ala Met Ala Phe Phe Glu	
830 835 840	
tat tca aat ctt ata ata ccc tta act atc ata act aat ata tat ata	3316
Tyr Ser Asn Leu Ile Ile Pro Leu Thr Ile Ile Thr Asn Ile Tyr Ile	
845 850 855	
tat ata tat att aag caa aga tat agc tca ggg atg atg ata ctc ggt	3364
Tyr Ile Tyr Ile Lys Gln Arg Tyr Ser Ser Gly Met Met Ile Leu Gly	
860 865 870	
gct ctt ctc tcc act att ata cta ccc atc ggg tct gga tct aga gct	3412
Ala Leu Leu Ser Thr Ile Ile Leu Pro Ile Gly Ser Gly Ser Arg Ala	
875 880 885 890	
ggc att ata gtt gtg cta cta cag gtt ata att tta ttg ttg aat aca	3460
Gly Ile Ile Val Val Leu Leu Gln Val Ile Ile Leu Leu Leu Asn Thr	
895 900 905	
att gta ata aaa aga caa acg ata aga ttt ttc ctg tat tta gtt ccg	3508
Ile Val Ile Lys Arg Gln Thr Ile Arg Phe Phe Leu Tyr Leu Val Pro	
910 915 920	
ata cta ata tta cta tta gtg ata tta cgt ttt gat aat ttg gtg agc	3556
Ile Leu Ile Leu Leu Leu Val Ile Leu Arg Phe Asp Asn Leu Val Ser	
925 930 935	
ata tat aat aga ata atc aat ttg cgg tcg gga agt agt gaa tct aga	3604
Ile Tyr Asn Arg Ile Ile Asn Leu Arg Ser Gly Ser Ser Glu Ser Arg	
940 945 950	
ttt tct ttg tac aag gat acc gta cac tca gta att act gac tca cta	3652
Phe Ser Leu Tyr Lys Asp Thr Val His Ser Val Ile Thr Asp Ser Leu	
955 960 965 970	
ttt ctg gga aaa ggt gta aaa gaa ttg tgg tta aat agt gat tta cca	3700
Phe Leu Gly Lys Gly Val Lys Glu Leu Trp Leu Asn Ser Asp Leu Pro	
975 980 985	
cta gga tcg cat tcg acc tac ata ggt tat ttc tat aaa act ggc cta	3748
Leu Gly Ser His Ser Thr Tyr Ile Gly Tyr Phe Tyr Lys Thr Gly Leu	
990 995 1000	
ttt gga cta ata aat gtg att tta ggt ttg ttt cta att ctt att agc	3796
Phe Gly Leu Ile Asn Val Ile Leu Gly Leu Phe Leu Ile Leu Ile Ser	
1005 1010 1015	

att atc aag gaa gct aaa aag tca gat ttc tat tat gag ata gta ggg Ile Ile Lys Glu Ala Lys Lys Ser Asp Phe Tyr Tyr Glu Ile Val Gly 1020 1025 1030	3844
tct gtc ata ctc cta ttt tca ttt ttt gca ctt gaa gat att gat ggc Ser Val Ile Leu Leu Phe Ser Phe Phe Ala Leu Glu Asp Ile Asp Gly 1035 1040 1045 1050	3892
gcc aat tgg ctc att att ttt gtc ttt aca gtg ttg gga att tta gaa Ala Asn Trp Leu Ile Ile Phe Val Phe Thr Val Leu Gly Ile Leu Glu 1055 1060 1065	3940
aat aag gat ttc tat agt caa ctt aaa agg tgg gaa agt ta atg gaa Asn Lys Asp Phe Tyr Ser Gln Leu Lys Arg Trp Glu Ser Met Glu 1070 1075 1080	3987
aaa caa ata ctt gtt tct atc gtt ata cct ata tac aac tcg gaa gca Lys Gln Ile Leu Val Ser Ile Val Ile Pro Ile Tyr Asn Ser Glu Ala 1085 1090 1095	4035
tat ctt aaa gaa tgc gtg caa tcc gtc cta caa cag act cat tca ttg Tyr Leu Lys Glu Cys Val Gln Ser Val Leu Gln Gln Thr His Ser Leu 1100 1105 1110	4083
ata gaa gtt ata ctg att aat gat gga tcc act gat aat agt gga gaa Ile Glu Val Ile Leu Ile Asn Asp Gly Ser Thr Asp Asn Ser Gly Glu 1115 1120 1125	4131
att tgt gat aat tta tct caa aaa gac gat cgc ata ctt gta ttt cat Ile Cys Asp Asn Leu Ser Gln Lys Asp Asp Arg Ile Leu Val Phe His 1130 1135 1140 1145	4179
aaa aaa aat gga ggg gta tct tcg gca agg aac cta ggt ctt gat aaa Lys Lys Asn Gly Gly Val Ser Ser Ala Arg Asn Leu Gly Leu Asp Lys 1150 1155 1160	4227
tcc aca ggc gaa ttc ata acg ttt gta gat agt gat gat ttt gta gca Ser Thr Gly Glu Phe Ile Thr Phe Val Asp Ser Asp Asp Phe Val Ala 1165 1170 1175	4275
ccg aat ata att gaa ata atg tta aaa aat tta atc act gag gat gct Pro Asn Ile Ile Glu Ile Met Leu Lys Asn Leu Ile Thr Glu Asp Ala 1180 1185 1190	4323
gat ata gca gaa gta gat ttt gat att tcg aat gag aga gat tat aga	4371

Asp Ile Ala Glu Val Asp Phe Asp Ile Ser Asn Glu Arg Asp Tyr Arg	
1195	1200 1205
aag aaa aaa aga cga aac ttt tat aag gtc ttt aaa aac aat aat tct	4419
Lys Lys Lys Arg Arg Asn Phe Tyr Lys Val Phe Lys Asn Asn Asn Ser	
1210	1215 1220 1225
tta aaa gaa ttt tta tca ggt aat aga gtg gaa aat att gtt tgt aca	4467
Leu Lys Glu Phe Leu Ser Gly Asn Arg Val Glu Asn Ile Val Cys Thr	
	1230 1235 1240
aaa tta tat aaa aaa agt ata att ggt aac ttg agg ttt gat gag aat	4515
Lys Leu Tyr Lys Lys Ser Ile Ile Gly Asn Leu Arg Phe Asp Glu Asn	
	1245 1250 1255
tta aaa att ggt gag gat tta ctt ttt aat tgt aaa att tta tgt caa	4563
Leu Lys Ile Gly Glu Asp Leu Leu Phe Asn Cys Lys Ile Leu Cys Gln	
	1260 1265 1270
gag cac tgc ata gtc gta gat acg act tct tcc ttg tac acc tat cgc	4611
Glu His Cys Ile Val Val Asp Thr Thr Ser Ser Leu Tyr Thr Tyr Arg	
	1275 1280 1285
atc gta aag act tct gca atg aat cag gag ttc aac gaa aat tca tta	4659
Ile Val Lys Thr Ser Ala Met Asn Gln Glu Phe Asn Glu Asn Ser Leu	
	1290 1295 1300 1305
gat ttt ata aca att ttt aat gaa ata agc agt att gtt cct gca aaa	4707
Asp Phe Ile Thr Ile Phe Asn Glu Ile Ser Ser Ile Val Pro Ala Lys	
	1310 1315 1320
tta gct aat tat gtt gaa gcg aaa ttt tta aga gaa aag gta aag tgt	4755
Leu Ala Asn Tyr Val Glu Ala Lys Phe Leu Arg Glu Lys Val Lys Cys	
	1325 1330 1335
ctc cga aaa atg ttt gaa tta ggt agt aat att gac agt aaa atc aaa	4803
Leu Arg Lys Met Phe Glu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Ser Lys Ile Lys	
	1340 1345 1350
tta caa cga gag att ttt ttc aaa gat gtt aaa tta tac cct ttc tat	4851
Leu Gln Arg Glu Ile Phe Phe Lys Asp Val Lys Leu Tyr Pro Phe Tyr	
	1355 1360 1365
aaa gcg gtt aag tac tta tca tta aag gga tta ttg agt att tac tta	4899
Lys Ala Val Lys Tyr Leu Ser Leu Lys Gly Leu Leu Ser Ile Tyr Leu	
	1370 1375 1380 1385

atg aaa tgt tca ccc atc ttg tat ata aaa tta tat gac agg ttt caa	4947
Met Lys Cys Ser Pro Ile Leu Tyr Ile Lys Leu Tyr Asp Arg Phe Gln	
1390 1395 1400	
aaa cag taagtaatca aaaattaaat taactcaatt accttttaaa ttataggagt	5003
Lys Gln	
tgaaa atg aat tat agt atc att atg tcg gta tat aat gag cct tta aat	5053
Met Asn Tyr Ser Ile Ile Met Ser Val Tyr Asn Glu Pro Leu Asn	
1405 1410 1415	
tat gtg aga gat tca gta gaa tct ata tta aat caa acg ctt act gat	5101
Tyr Val Arg Asp Ser Val Glu Ser Ile Leu Asn Gln Thr Leu Thr Asp	
1420 1425 1430	
ttt gag ttc ata att gtc att gat aat cca agt aga ggt gat tta aag	5149
Phe Glu Phe Ile Ile Val Ile Asp Asn Pro Ser Arg Gly Asp Leu Lys	
1435 1440 1445 1450	
caa ttc tta aca gaa tat tca gtt gta gat aat aga ata aaa atc ttg	5197
Gln Phe Leu Thr Glu Tyr Ser Val Val Asp Asn Arg Ile Lys Ile Leu	
1455 1460 1465	
ctt aat gaa gaa aat att ggt tta gca tca agt ttg aac aaa gcg gtg	5245
Leu Asn Glu Glu Asn Ile Gly Leu Ala Ser Ser Leu Asn Lys Ala Val	
1470 1475 1480	
aaa att tct aag gga gaa tat att ttt aga atg gat gct gat gat att	5293
Lys Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Ile Phe Arg Met Asp Ala Asp Asp Ile	
1485 1490 1495	
tca tat cca agt aga ttt gat aag caa att cgt ttt atg gag gaa aat	5341
Ser Tyr Pro Ser Arg Phe Asp Lys Gln Ile Arg Phe Met Glu Glu Asn	
1500 1505 1510	
tca ttg gat ttc tca gca act cta ata gaa ttg ata gac caa aaa gga	5389
Ser Leu Asp Phe Ser Ala Thr Leu Ile Glu Leu Ile Asp Gln Lys Gly	
1515 1520 1525 1530	
aat tta gta tat aaa caa cga gaa agt aat aaa ata tac tta act aat	5437
Asn Leu Val Tyr Lys Gln Arg Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Leu Thr Asn	
1535 1540 1545	
gat ata cgg aag atg tta ttg aat aga tct ata ctt gcc cac cca acg	5485
Asp Ile Arg Lys Met Leu Leu Asn Arg Ser Ile Leu Ala His Pro Thr	

1550	1555	1560	
tgg tgc gta aaa aag aaa gtt ttc gat aag tta atg gga tat aga gat			5533
Trp Cys Val Lys Lys Lys Val Phe Asp Lys Leu Met Gly Tyr Arg Asp			
1565	1570	1575	
tta gta cct gtt gaa gat tat gat ttt gca ata aga gga gct ctg gct			5581
Leu Val Pro Val Glu Asp Tyr Asp Phe Ala Ile Arg Gly Ala Leu Ala			
1580	1585	1590	
gat ttc aaa atc ggc tta ctc aat aaa gta ctt tta cag tat aga tta			5629
Asp Phe Lys Ile Gly Leu Leu Asn Lys Val Leu Leu Gln Tyr Arg Leu			
1595	1600	1605	1610
aac gag aat gga ata tca caa acc aat aag ttt aag caa tat att tac			5677
Asn Glu Asn Gly Ile Ser Gln Thr Asn Lys Phe Lys Gln Tyr Ile Tyr			
1615	1620	1625	
tca gct att tta caa gat ttt tat aaa gaa aaa tct tat att gat atc			5725
Ser Ala Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Lys Glu Lys Ser Tyr Ile Asp Ile			
1630	1635	1640	
aca aaa att act aat tac ttt caa gag tat gtg ata aag aaa cgc tat			5773
Thr Lys Ile Thr Asn Tyr Phe Gln Glu Tyr Val Ile Lys Lys Arg Tyr			
1645	1650	1655	
act cag caa gag ctc tct aaa tat ttt gag cta aaa tct acc cct agt			5821
Thr Gln Gln Glu Leu Ser Lys Tyr Phe Glu Leu Lys Ser Thr Pro Ser			
1660	1665	1670	
att act att aga aaa cta tat att tgt tta tat tta tac ttt aag tct			5869
Ile Thr Ile Arg Lys Leu Tyr Ile Cys Leu Tyr Leu Tyr Phe Lys Ser			
1675	1680	1685	1690
ccc ttg gtt agg agg tta tta ata aat gat att aat att tta gta ctg			5917
Pro Leu Val Arg Arg Leu Leu Ile Asn Asp Ile Asn Ile Leu Val Leu			
1695	1700	1705	
aaa ttg ttt gga gga gag aaa caa agt gac taatagaaaa atttatgtat			5967
Lys Leu Phe Gly Gly Glu Lys Gln Ser Asp			
1710	1715		
gtcatactct ttatcattta ttgatttggtt tatataaaga agagatatat tcaaatttag 6027			
aaattattct ctcttcttct attcctgatg ttgataattt agagaaaaaa ttaaaatcaa 6087			

aaacaataaa tatacatatt ttagaagaat ctagtggtga aagtgaagaa ttattatcag 6147
 tacttaaaga tgctggtcta agttatagta agtttgatag taattgtttt atttttaatg 6207
 atgcaacgcc tattgggagg acactaataa agcatggtat ttattataat ctaattgaag 6267
 atggtttaaa ttgttttact tactctatat ttagtcaaaa actttggaag tattatgtaa 6327
 aaaaatatat tcttcacaaa attcagccac atggattttc acgatattgt ttagggattg 6387
 aagttaattc attagttaat ttgccaaagg atccgcgta taaaaaattt attgaagtcc 6447
 ctaggaaaga actttttgac aatgtaacag aatatcaaaa agaaatggca ataaatcttt 6507
 ttggagcagt aagagttagt attaaatcac cttcagtact agtattaacg cagcctctat 6567
 ctatagataa agagtttatg agttataaca ataagataga aacgtccgaa gaacaattta 6627
 atttttataa atcaatagtc aatgaatata taaataaagg gtacaatggt tattttaaag 6687
 ttcctcctag agatgtagta gattattcca aattgccggt agagctatta ccatcaaag 6747
 ttcctatgga aattatagag ttgatgttaa caggtcgggt cgaatgtggg ataacacatt 6807
 cgtccactgc gctggatttt ttaactgtg ttgataaaaa aataacttta gtagatct 6865

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

gggggatcca atggtattga aatacag 27

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

aatctgcaga cttagctcct gtcccgagt 29

<210> 6
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 6
 ccaagcggcc gctatagtca acttaaaagg tgg 33

<210> 7
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 7
 cggtcgcagt cccaataggc gttgcatc 28

<210> 8
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400>
 ccggaattcg aaaaggtaaa gtgtctccga aa 32

(Brief explanation of the drawings)

(Fig. 1) shows the structure of capsular polysaccharide biosynthesis genes in *Streptococcus agalactiae* Type Ia and Type Ib.

(Fig. 2) shows the construction steps of β 1,3-galactosyltransferase plasmids pBBPIJ and pBBPJ.

(Explanation of symbols)

Plac: lac promoter

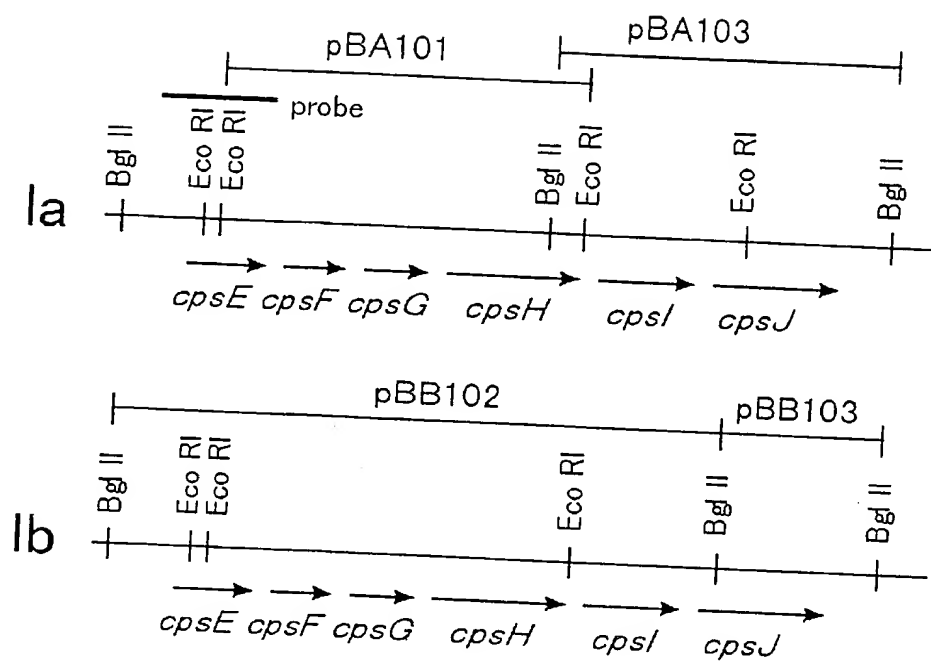
cpsI: β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase gene

cpsJ: β 1,4-galactosyltransferase gene

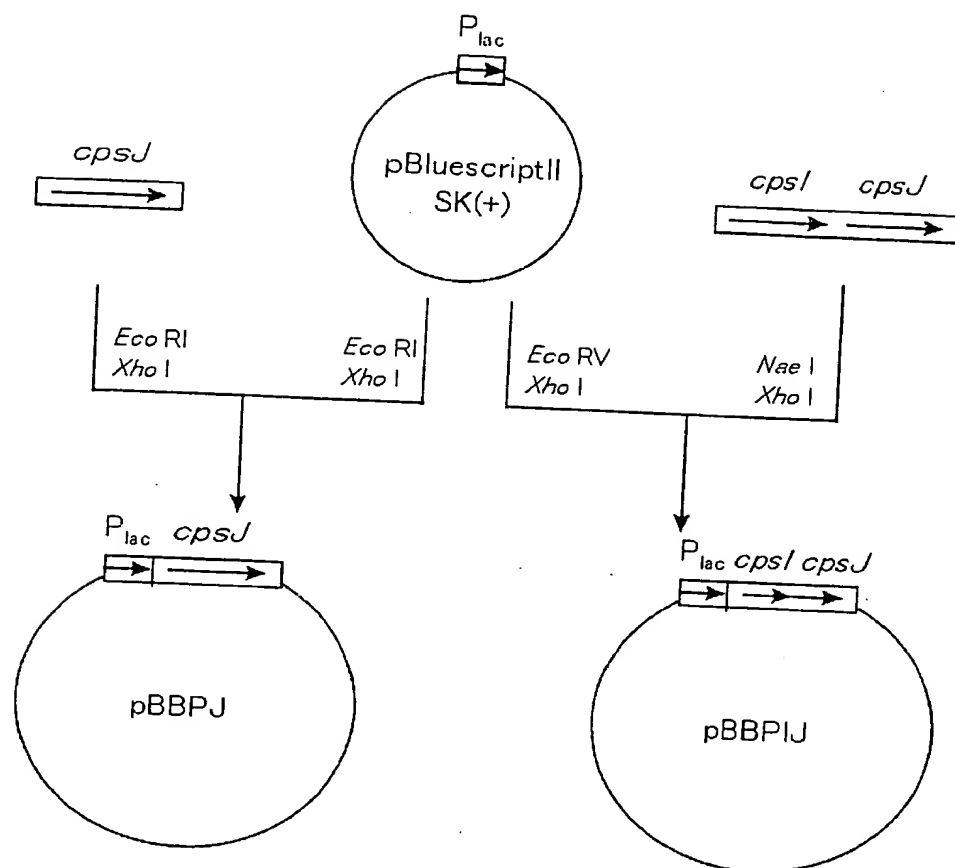
(Document name)

Drawings

(Fig. 1)



(Fig. 2)



(Document name)

Abstract

(Abstract)

(Problems)

It is to provide a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity, a DNA encoding the protein, a method for producing a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity using a transformant containing the DNA, and a method for producing a galactose-containing carbohydrate using the protein.

(Means for solution)

The present invention provides a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity, a DNA encoding the protein, a recombinant DNA containing the DNA, a transformant containing the recombinant DNA, a method for producing a protein having a β 1,3-galactosyltransferase activity using the transformant, and a method for producing a galactose-containing carbohydrate using the transformant.

(Selected drawing)

None

整理番号＝H 1 2－2 1 1 A 4

提出日 平成 1 3 年 1 月 5 日
頁: 1 / 1

【書類名】 特許願

【整理番号】 H 1 2－2 1 1 A 4

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成 1 3 年 1 月 5 日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C 1 2 P 1 9 / 0 0

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区不老町 名古屋大学内

【氏名】 三宅 克英

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区不老町 名古屋大学内

【氏名】 渡邊 正樹

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区不老町 名古屋大学内

【氏名】 飯島 信司

【特許出願人】

【識別番号】 0 0 0 0 0 1 0 2 9

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 0 0 8 1 8 7

【納付金額】 2 1 0 0 0

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 β 1, 3－ガラクトース転移酵素および該酵素をコードする DNA

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 N－アセチルグルコサミンに β 1, 3 結合でガラクトースを転移する活性を有する微生物由来の β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質。

【請求項 2】 微生物が、ストレプトコッカス属に属する微生物である請求項 1 に記載の蛋白質。

【請求項 3】 ストレプトコッカス属に属する微生物が、ストレプトコッカス・アガラクチエである請求項 2 に記載の蛋白質。

【請求項 4】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質。

【請求項 5】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質。

【請求項 6】 請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする DNA。

【請求項 7】 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA。

【請求項 8】 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質をコードする DNA。

【請求項 9】 請求項 6～8 のいずれか 1 項に記載の DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA。

【請求項 10】 請求項 9 に記載の組換え体 DNA を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項 11】 宿主細胞が、微生物である請求項 10 に記載の形質転換体。

【請求項 12】 微生物が、エシェリヒア属に属する微生物である請求項 11 に記載の形質転換体。

【請求項 1 3】 エシェリヒア属に属する微生物がエシェリヒア・コリである請求項 1 2 に記載の形質転換体。

【請求項 1 4】 請求項 1 0 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取する、 β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質の製造方法。

【請求項 1 5】 請求項 1 0 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の形質転換体の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、ウリジン－5'－二リン酸ガラクトースおよび受容体糖質を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でガラクトース含有糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中からガラクトース含有糖質を採取することを特徴とするガラクトース含有糖質の製造法。

【請求項 1 6】 培養液の処理物が、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品である請求項 1 5 に記載の製造法。

【請求項 1 7】 受容体糖質が、非還元末端に N－アセチルグルコサミンを有する糖質である請求項 1 5 に記載の製造法。

【請求項 1 8】 受容体糖質が、N－アセチルグルコサミン、またはラクトー N－トリオース II である請求項 1 5 に記載の製造法。

【請求項 1 9】 ガラクトース含有糖質が、ラクトー N－ビオース、またはラクトー N－テトラオースである請求項 1 5 に記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、 β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードする DNA、該 DNA を含有する組換え体 DNA、該組換え体 DNA を保有する形質転換体、該形質転換体を用いた β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性

を有する蛋白質の製造法、および該形質転換体を用いたガラクトース含有糖質の製造法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

β 1, 3 - ガラクトース転移酵素遺伝子に関しては、高等動物由来の遺伝子[J. Biol. Chem., 273, 58 (1998)、J. Biol. Chem., 273, 12770 (1998)、J. Biol. Chem., 274, 12499 (1999)]が取得されているが、一般に動物細胞由来の遺伝子を微生物を用いて活性のある蛋白質として発現させることは困難な場合が多く、動物由来の β 1, 3 - ガラクトース転移酵素遺伝子は大腸菌などの微生物を用いて活性のある蛋白質として発現させた例はない。

【 0 0 0 3 】

一方、微生物においては、キャンピロバクター・ジェジュニから β 1, 3 - ガラクトース転移酵素遺伝子が取得されており、大腸菌を用いて該酵素遺伝子を発現させた報告があるが、該酵素は、N - アセチルガラクトサミンにガラクトースを転移する活性を有するが、N - アセチルグルコサミンにガラクトースを転移する活性については報告されていない[J. Biol. Chem., 274, 12499 (1999)]。

【 0 0 0 4 】

人乳中にはガラクトース含有糖質（ラクトーN - テトラオースが主要成分のひとつ）が豊富に含まれている [Acta Paediatr., 82, 903 (1993)、J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 30, 181 (2000)]。ガラクトース含有オリゴ糖であるラクトーN - テトラオースやラクトーN - ネオテトラオースは、シュードモナス・エアルギノーサにより認識されることが知られていることから [Infect. Immun., 59, 700 (1991)]、ガラクトース含有糖質はシュードモナス・エアルギノーサの人体への感染を妨げる、安全な感染予防薬の有力な候補と考えられる。

【 0 0 0 5 】

しかしながら、ラクトーN - テトラオースなどのガラクトース含有糖質の製造に関しては、人乳からの抽出法や化学合成法が知られているが、いずれもコスト面や生産性の面で問題があり、工業的な製造法は未だ確立されていない。

【 0 0 0 6 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、 β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該DNAを用いた β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質の製造法、および該蛋白質を用いたガラクトース含有糖質の製造法を提供することにある。

【0 0 0 7】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行い、ストレプトコッカス・アガラクチエの夾膜多糖生合成に関与する遺伝子群の中に、これまで見出されていなかった β 1, 3－ガラクトース転移酵素をコードするDNAを見出し、該DNAを取得することにより本発明を完成するに至った。

【0 0 0 8】

即ち、本発明は以下の(1)～(19)に関する。

- (1) N－アセチルグルコサミンに β 1, 3結合でガラクトースを転移する活性を有する微生物由来の β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質。
- (2) 微生物が、ストレプトコッカス属に属する微生物である上記(1)の蛋白質。
- (3) ストレプトコッカス属に属する微生物が、ストレプトコッカス・アガラクチエである上記(2)の蛋白質。
- (4) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質。
- (5) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において1個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質。
- (6) 上記(1)～(5)のいずれか1つの蛋白質をコードするDNA。
- (7) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA。
- (8) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA。
- (9) 上記(6)～(8)のいずれか1つのDNAをベクターに組み込んで得

られる組換え体DNA。

(10) 上記(9)の組換え体DNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(11) 宿主細胞が、微生物である上記(10)の形質転換体。

(12) 微生物が、エシェリヒア属に属する微生物である上記(11)に記載の形質転換体。

(13) エシェリヒア属に属する微生物がエシェリヒア・コリである上記(12)の形質転換体。

(14) 上記(10)～(13)のいずれか1つの形質転換体を培地に培養し、培養物中に β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取する、 β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質の製造方法。

(15) (10)～(13)のいずれか1つの形質転換体の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、ウリジン-5'-ニリン酸ガラクトースおよび受容体糖質を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でガラクトース含有糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中からガラクトース含有糖質を採取することを特徴とするガラクトース含有糖質の製造法。

(16) 培養液の処理物が、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品である上記(15)の製造法。

(17) 受容体糖質が、非還元末端にN-アセチルグルコサミンを有する糖質である上記(15)の製造法。

(18) 受容体糖質が、N-アセチルグルコサミン、またはラクトーN-トリオースIIである上記(15)の製造法。

(19) ガラクトース含有糖質が、ラクトーN-ビオース、またはラクトーN-テトラオースである上記(15)の製造法。

【発明の実施の形態】

本発明の β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質は、非還元末端にN－アセチルグルコサミン（以下、G l c N A cと略す）を有する受容体糖質を基質とする微生物由来の β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質であり、例えば、好ましくはストレプトコッカス属に属する微生物由来の β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質、より好ましくはストレプトコッカス・アガラクチエ由来の β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質をあげることができる。

【0 0 1 0】

本発明の蛋白質として、具体的には、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をあげることができ、また、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、1 つ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質もまた本発明の蛋白質としてあげることができる。

【0 0 1 1】

上記の 1 つ以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第 2 版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Res., 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Res., 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA に変異を導入することにより取得することができる。

【0 0 1 2】

欠失、置換若しくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数であり、1 個

～数十個、好ましくは1個～20個、より好ましくは1個～10個、さらに好ましくは1個～5個である。

また、本発明の蛋白質が β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するためには、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403(1990)] やFASTA [Methods. Enzymol., 183, 63(1990)] 等を用いて計算したときに、配列番号1で表されるアミノ酸配列と少なくとも50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましく95%以上の相同性を有していることが好ましい。

【0013】

本発明のDNAとしては、上記本発明の蛋白質をコードするDNAをあげることができる。

具体的には、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA、配列番号2で表される塩基配列からなるDNA、または配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列からなるDNAであり、かつ β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAをあげることができる。

【0014】

上記のストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、配列番号2で表される塩基配列からなるDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0 mol/lの塩化ナトリウム存在下、65°Cでハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/l塩化ナトリウム、15 mmol/l クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65°C条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

【0015】

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)

等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLASTやFASTA等を用いて計算したときに、配列番号2で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0016】

本発明の β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質を生産する形質転換体は、例えば上記した本発明のDNAをモレキュラー・クローニング第2版に記載の方法に従ってベクターDNAと連結することで組換え体DNAを作製し、該組換え体DNAを用いてモレキュラー・クローニング第2版に記載の方法に従い宿主細胞を形質転換することにより取得することができる。

【0017】

以下に本発明を詳細に説明する。

[1] 本発明のDNAの調製

本発明のDNAはストレプトコッカスに属する微生物より調製することができる。ストレプトコッカスに属する微生物としては、例えばストレプトコッカス・アガラクチェをあげることができ、具体的にはストレプトコッカス・アガラクチェ Type Ib等をあげることができる。

【0018】

ストレプトコッカスに属する微生物を公知の方法[例えば、J. Bacteriol., 181, 5176 (1999)に記載の方法]により培養する。

培養後、公知の方法（例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法）により、該微生物の染色体DNAを単離精製する。

本発明のDNAを含む断片は、ストレプトコッカス・アガラクチェ Type III またはType Iaの夾膜多糖合成遺伝子群中の塩基配列に基づいて設計された合成DNAを用いて、ハイブリダイゼーション法、PCR法などにより取得することができる。

【0019】

該DNAを連結するベクターとしては、大腸菌K 1 2株中で自立複製可能なベクターであればファージベクター、プラスミドベクター等いずれも使用可能であるが、具体的には、ZAP Express[ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)], pBluescript II SK(+)[ストラタジーン社製、Nucleic Acids Res., 17, 94 (1989)], λ zap II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11[DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)], λ TriplEx (クローンテック社製)、λ ExCell (アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製)、pUC18[Gene, 33, 103 (1985)]等をあげることができる。

【 0 0 2 0 】

該ベクターに上記で取得した本発明のDNAを連結して得られる組換え体DNAの宿主に用いるエシェリヒア・コリは、エシェリヒア・コリに属する微生物であればいずれでも用いることができるが、具体的には、Escherichia coli XL1-B lue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)], Escherichia coli i C600 [Genetics, 39, 440 (1954)], Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)], Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)], Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)], Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)], Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]等をあげることができる。

【 0 0 2 1 】

組換え体DNAの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-2483942)、エレクトロポレーション法[Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]等をあげることができる。

【 0 0 2 2 】

上記のようにして得られた形質転換体から組換え体DNAを抽出し、該組換えDNAに含まれる本発明のDNAの塩基配列を決定することができる。塩基配列の決定には、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばジデオキシ法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)]または373A・DNAシーケンサー (パー

キン・エルマー社製)等の塩基配列分析装置を用いることができる。

【0023】

また、上記において決定されたDNAの塩基配列に基づいて、パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成装置等を用いて化学合成することによっても目的とするDNAを調製することもできる。

上記のようにして取得した組換え体DNAを保有する形質転換体として、例えば配列番号2で表される塩基配列を有するプラスミドDNAを保有するEscherichia coli JM109/pBBPJをあげることができる。

〔2〕本発明の蛋白質の調製

本発明の蛋白質は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、上記〔1〕の方法により取得した本発明のDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

【0024】

本発明のDNAを用いる際には、必要に応じて、本発明の蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製することができる。また、該蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、該蛋白質の生産率を向上させることもできる。

本発明のDNAを発現する形質転換体は、上記DNA断片を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換え体DNAを作製し、該組換え体DNAを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより取得することができる。

【0025】

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0026】

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明のDNAを含有してなる組換え体DNAは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、より構成された組換え体DNAであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【 0 0 2 7 】

発現ベクターとしては、pHelix1 (ロシュ・ダイアグノスティクス社製)、pKK 233-2 (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)、pSE280 (インビトロジェン社製)、pGEMEX-1 (プロメガ社製)、pQE-8 (キアゲン社製)、pET-3 (ノバジェン社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200[Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1[Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK(+), pBluescript I I KS(+)(ストラタジーン社製)、pTrS30 [大腸菌JM109/pTrS30(FERM BP-5407)より調製]、pTrS32 [大腸菌JM109/pTrS32(FERM BP-5408)より調製]、pPAC31 (WO 98/12343)、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28(宝酒造社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pPA1 (特開昭63-233798)等を例示することができる。

【 0 0 2 8 】

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P_{trp})、lacプロモーター (P_{lac})、 P_L プロモーター、 P_R プロモーター、 P_{SE} プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、 $SPO1$ プロモーター、 $SPO2$ プロモーター、 $penP$ プロモーター等をあげることができる。また P_{trp} を2つ直列させたプロモーター ($P_{trp} \times 2$)、lacプロモーター、 $lacT7$ プロモーター、 $let I$ プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【 0 0 2 9 】

リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の組換え体DNAにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【 0 0 3 0 】

原核生物としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属、ストレプトコッカス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC100、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus megaterium、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium ammoniagenes、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110、Streptococcus agalactiae Type Ia、Streptococcus agalactiae Type Ib、Streptococcus agalactiae Type III、Streptococcus pneumoniae Type 14等をあげることができる。

【 0 0 3 1 】

組換え体DNAの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法(特開昭63-2483942)、エレクトロポレーション法[Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]等をあげることができる。

【 0 0 3 2 】

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE p13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等

を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1 プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

【 0 0 3 3 】

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属、ピチア属、キャンディタ属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris、Candida utilis等をあげることができる。

【 0 0 3 4 】

組換え体DNAの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法[Methods Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法[J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]等をあげることができる。

【 0 0 3 5 】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNAI、pcDM8（フナコシ社より市販）、pAGE107（特開平3-22979）、pAS3-3（特開平2-227075）、pCDM8[Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNAI/Amp（インビトロジェン社製）、pREP4（インビトロジェン社製）、pAGE103[J. Biochem, 101, 1307 (1987)]、pAGE210、pAmo、pAmoA等を用いることができる。

【 0 0 3 6 】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス（CMV）のIE（immediate early）遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロ

モーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【 0 0 3 7 】

宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞またはNamalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

【 0 0 3 8 】

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293(ATCC: CRL-1573)、293等、ヒト白血病細胞としては、BALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7等をあげることができる。

組換え体DNAの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。

【 0 0 3 9 】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばBaculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Molecular Biology, A Laboratory Manual、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

【 0 0 4 0 】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともにインビトロジェン社製）等をあげることができる。

【 0 0 4 1 】

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

【 0 0 4 2 】

Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞としてはSf9、Sf21（バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル）等、Trichoplusia niの卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4（インビトロジェン社製）等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等をあげることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

【 0 0 4 3 】

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

【 0 0 4 4 】

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であれ

ばいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション法 (特開昭60-251887)、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606856、特許第2517813) 等をあげることができる。

【0045】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

【0046】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明の蛋白質を製造することができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0047】

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

【0048】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステ

ーブリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

【 0 0 4 9 】

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常5時間～7日間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【 0 0 5 0 】

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【 0 0 5 1 】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地[J. Am. Med. Assoc., 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地[Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地[Virology, 8, 396 (1959)]、199培地[Proc. Soc. Biol. Med., 73, 1 (1950)]またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【 0 0 5 2 】

培養は、通常pH6～8、25～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地(ファーマンジェン社製)、Sf-900 II SFM培地(ライフ・テクノロジーズ社製)、ExCell400、ExCell405[いずれもJRHバイオサイエンス社製]、Grace's Insect Medium[Nature, 195, 788 (1962)]等を用いることができる。

【0053】

培養は、通常pH6～7、25～30℃等の条件下で1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

【0054】

培養は、通常pH5～9、20～40℃の条件下で3～60日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、本発明の蛋白質をコードするDNAを組み込んだ組換え体DNAを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。

【0055】

本発明の蛋白質の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる蛋白質の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

本発明の蛋白質が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法[J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法[Proc.

Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]
、または特開平05-336963、特開平06-823021等に記載の方法を準用することにより、該蛋白質を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

【 0 0 5 6 】

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明の蛋白質の活性部位を含む蛋白質の手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明の蛋白質を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

【 0 0 5 7 】

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いて本発明の蛋白質を製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該蛋白質を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。

【 0 0 5 8 】

動物個体を用いて本発明の蛋白質を製造する方法としては、例えば公知の方法 [Am. J. Clin. Nutr., 63, 639S (1996)、Am. J. Clin. Nutr., 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に本発明の蛋白質を生産する方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、本発明の蛋白質をコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、該蛋白質を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭63-309192）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである α カゼインプロモーター、 β カゼインプロモーター

ター、 β ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【 0 0 5 9 】

植物個体を用いて本発明の蛋白質を製造する方法としては、例えば本発明の蛋白質をコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法[組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends Biotechnol., 15, 45 (1997)]に準じて栽培し、該蛋白質を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を生産する方法があげられる。

【 0 0 6 0 】

本発明の形質転換体により製造された蛋白質を単離・精製する方法としては、通常の酵素の単離、精製法を用いることができる。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

【 0 0 6 1 】

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE)－セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【 0 0 6 2 】

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該蛋白質を回収後、該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。

該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該蛋白質を正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【 0 0 6 3 】

本発明の蛋白質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該蛋白質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。

即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【 0 0 6 4 】

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をあげることができる。

また、本発明の蛋白質を他の蛋白質との融合蛋白質として生産し、融合した蛋白質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、特開平05-336963、特開平06-823021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテイン A との融合タンパク質として生産し、イムノグロブリン G を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

【 0 0 6 5 】

また、本発明の蛋白質を F l a g ペプチドとの融合蛋白質として生産し、抗 F l a g 抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]。更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

【 0 0 6 6 】

上記で取得された蛋白質のアミノ酸情報を基に、F m o c 法（フルオレニルメ

チルオキシカルボニル法)、t B o c 法 (t - ブチルオキシカルボニル法) 等の化学合成法により、本発明の蛋白質を製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、Pharmacia社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

[3] ガラクトース含有糖質の調製

上記 [2] の培養により得られた形質転換体の培養液および該培養液の処理物を酵素源として用い、水性媒体中でガラクトース含有糖質を製造することができる。

【 0 0 6 7 】

培養液の処理物としては、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品などをあげることができる。

【 0 0 6 8 】

ガラクトース含有糖鎖の生成において用いられる酵素源は、37°Cで1分間に1 m molのガラクトース含有糖質を生成することのできる活性を1単位 (U) として、1 mU/l～1,000 U/lであり、好ましくは10 mU/l～100 U/lの濃度で用いる。

ガラクトース含有糖鎖の生成において用いられる水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。

【 0 0 6 9 】

ガラクトース含有糖質の生成において、必要に応じて界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン (例えばナイミーンS-215、日本油脂社製) などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルア

ンモニウムクロライド（例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製）などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・サルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば三級アミンFB、日本油脂社製）などの三級アミン類など、ガラクトース含有糖質の生成を促進するものであればいずれでもよく、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常0.1～50 g/lの濃度で用いられる。有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどが挙げられ、通常0.1～50 ml/lの濃度で用いられる。

【0070】

ガラクトース含有糖鎖の生成反応は水性媒体中、pH 5～10、好ましくはpH 6～8、20～50℃の条件で1～96時間行う。該生成反応において、必要に応じてMnCl₂、MgCl₂等の無機塩等を添加することができる。

水性媒体中に生成したガラクトース含有糖鎖の定量はDionex社製の糖分析装置などを用いて行うことができる[Anal. Biochem., 189, 151 (1990)]。

【0071】

反応液中に生成したガラクトース含有糖鎖の採取は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の方法によって行うことができる。

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0072】

【実施例】

実施例1 β 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子を含有するDNAの取得

[1] ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株からの夾膜多糖合成遺伝子のクローニング(1)

ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株をJ. Bacteriol., 181, 5176 (1999)記載の方法により培養した。遠心分離により菌体を取得した後、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法に従って、該微生物の染色体DNAを単離精製した。

【0073】

ストレプトコッカス・アガラクチエ Type IIIの夾膜多糖生合成遺伝子である cpsD 遺伝子周辺の塩基配列[Mol. Microbiol., 8, 843 (1993)]に基づいて設計された配列番号 4 および 5 で表される塩基配列からなる DNA をパーセプティブ・バイオシステムズ社製 8905 型 DNA 合成機を用いて合成した。該合成 DNA をプライマーセットとして用い、ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia 株の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。PCR は染色体 DNA 0.1 μ g、プライマー各 0.5 μ mol/l、Takara LA Taq ポリメラーゼ(宝酒造社製) 2.5 units、Takara LA Taq ポリメラーゼ用緩衝液 4 μ l、deoxyNTP 各 200 μ mol/l を含む反応液 40 μ l を用い、94°C で 1 分間、42°C で 2 分間、72°C で 3 分間の工程を 30 回繰り返すことにより行った。得られた増幅断片をランダムプライマー-DNA ラベリングキット(宝酒造社製)を用いてラベリングすることにより、プローブを調製した。

【 0 0 7 4 】

ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia 株の染色体 DNA を制限酵素 EcoRI により処理した断片を pBluescriptII SK(+) に連結して組換え体 DNA を作製し、該組換え体 DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換することによりライブラリーを作製した。

上記で調製したプローブおよびライブラリーを用いて、常法に従ってコロニーハイブリダイゼーションを行い、強いシグナルを示すクローン 1 株を取得した。この株の保有するプラスミドを pBA101 と命名し、その構造を解析したところ、pBluescriptII SK(+) にストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia 株の染色体 DNA 由来の 3.5kb の断片が挿入された構造であった。常法により該 DNA 断片の塩基配列を決定したところ、該 DNA 断片には、J. Bacteriol., 181, 5176 (1999) で cpsIaF、cpsIaG および cpsIaH と命名された 3 つの遺伝子と cpsIaE と命名された遺伝子の一部が見出され、該 DNA 断片は、夾膜多糖生合成遺伝子群の一部を含有する DNA であることが確認された。また、相同性検索の結果、cpsIaE 遺伝子はグルコース転移酵素遺伝子、cpsIaG 遺伝子は β 1, 4 - ガラクトース転移酵素遺伝子と高い相同性を示すことが確認された (図 1)。

[2] ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia 株からの夾膜多糖生合成遺伝子のクローニング (2)

実施例 1 の [1] で得られたプラスミド pBA101 に挿入されているストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia 株由来の 3.5kb の断片をランダムプライマー DNA ラベリングキット(宝酒造社製)を用いてラベリングすることにより、プローブを調製した。

【 0 0 7 5 】

ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia 株の染色体 DNA を制限酵素 Bgl I により処理した断片を pBluescript II SK(+) に連結して組換え体 DNA を作製し、該組換え体 DNA を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換することによりライブラリーを作製した。

上記で調製したプローブおよびライブラリーを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行い、強いシグナルを示すクローン 1 株を取得した。この株の保有するプラスミドを pBA103 と命名し、その構造を解析したところ、pBluescript II SK(+) にストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia 株の染色体 DNA 由来の 3.1kb の DNA 断片が挿入された構造であった。常法により該 3.1kb の DNA 断片の塩基配列を決定したところ、該 DNA 断片には、cpsIaI、cpsIaJ と命名した遺伝子と cpsIaH 遺伝子の一部が見出され、pBA103 に保有される DNA 断片は、pBA101 に保有される DNA 断片と染色体上で隣接している DNA であることがわかり、pBA103 もまた夾膜多糖合成遺伝子群の一部の DNA を保有するプラスミドであることが判明した。また、相同性検索の結果、cpsIaI 遺伝子は β 1, 3－N－アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子、cpsIaJ は β 1, 4－ガラクトース転移酵素遺伝子と高い相同性を示すことが確認された[図 1、J. Bacteriol., 181, 5176 (1999)]。

[3] ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib 株からの β 1, 3－ガラクトース転移酵素遺伝子を含有する DNA の取得

実施例 1 の [2] で得られたプラスミド pBA103 に挿入されているストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia 株由来の 3.1kb の断片をランダムプライマー DNA ラベリングキット(宝酒造社製)を用いてラベリングすることにより、プローブを調製した。

【 0 0 7 6 】

ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib株を、J. Bactriol., 181, 5176 (1999)記載の方法により培養した。遠心分離により菌体を取得した後、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法に従って、該微生物の染色体DNAを単離精製した。

ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib株の染色体DNAを制限酵素BglIにより処理した断片をpBluescriptII SK(+)に導入し、これを大腸菌JM109に形質転換することによりライブラリーを作製した。

【0077】

上記で調製したプローブおよびライブラリーを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行い、強いシグナルを示すクローン2株を取得した。これらの株の保有するプラスミドをそれぞれpBB102およびpBB103と命名し、その構造を解析したところ、それぞれpBluescriptII SK(+)にストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib株の染色体DNA由来の 5.5および 1.4kbの断片が挿入された構造であった(図1)。

【0078】

これら2つのDNA断片について、常法に従い塩基配列を決定したところ、該2つのDNA断片は染色体DNA上で隣接して存在しており、配列番号3で表される連続した塩基配列からなることが明らかとなった。配列番号3で表される塩基配列からなるDNAには、cpsIbE、cpsIbF、cpsIbG、cpsIbH、cpsIbI、およびcpsIbJと命名される遺伝子が存在することが判明した。相同性検索の結果、cpsIbE遺伝子はcpsIaE遺伝子およびグルコース転移酵素遺伝子、cpsIbG遺伝子はcpsIaG遺伝子および β 1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子、cpsIbI遺伝子はcpsIaI遺伝子および β 1, 3-N-アセチルガラクトサミン転移酵素遺伝子と相同性が高かったことから、配列番号3で表される塩基配列からなるDNAは、ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib株の夾膜多糖生合成遺伝子群の一部を含有するDNAであることが確認された。

【0079】

また、配列番号2で表される塩基配列からなるcpsIbJ遺伝子にコードされる蛋白質は、糖転移酵素の保存配列を有するが、cpsIaJ遺伝子と相同性が低いこと、

ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株における夾膜多糖合成において cpsIaJ 遺伝子産物はガラクトースの転移を担っていること[J. Bactriol., 181, 5176 (1999)]、およびストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株とストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib株では該ガラクトースの結合様式がそれぞれ $\beta 1, 4$ と $\beta 1, 3$ と異なっていること[J. Bactriol., 181, 5176 (1999)]から、cpsIbJ 遺伝子は $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAからなる遺伝子であると推定された。該DNAにコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号 1 に示した。

実施例 2 $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素遺伝子発現株の造成

パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成機を用いて合成した、配列番号 6 および 7 で表される塩基配列からなるDNAを用いて、実施例 1 の [3] で取得されたガラクトース転移酵素遺伝子を含むDNA断片を、下記の方法で増幅した。

【0080】

上記合成DNAをプライマーとして用い、ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。PCRは染色体DNA 0.1 μ g、プライマー各 0.5 μ mol/l、Takara LA Taqポリメラーゼ(宝酒造社製)2.5 units、Takara LA Taqポリメラーゼ用緩衝液 4 μ l、deoxyNTP各 200 μ mol/l を含む反応液 40 μ lを用い、94 $^{\circ}$ Cで1分間、42 $^{\circ}$ Cで2分間、72 $^{\circ}$ Cで3分間の工程を30回繰り返すことにより行った。

【0081】

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液からジーンクリーンIIキット(バイオ101社製)を用いて増幅断片を回収し、該DNAのTE[10 mmol/l Tris-HCl、1 mmol/l EDTA (pH 8.0)] 溶解液 20 μ lを得た。

該溶解液 5 μ lを用い、DNAを制限酵素NotIおよびXhoIで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキットにより2.0 kbのDNA断片を回収した。

【0082】

pBluescriptII SK(+) DNA 0.2 μ gを制限酵素NotIおよび XhoIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、ジーンクリーンIIキットにより 3.0 kbのDNA断片を回収した。

該 2.0 kbおよび 3.0 kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃で16時間、連結反応を行った。

【0083】

該連結反応液を用いて大腸菌JM109株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 μ g/mlを含むLB寒天培地[バクトトリプトン(ディフコ社製) 10 g/l、酵母エキス(ディフコ社製) 10 g/l、塩化ナトリウム 5 g/l、寒天15g/l]に塗布後、37℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、発現プラスミドであるpBBPIJを得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(図2)。

【0084】

同様に、パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成機を用いて合成した、配列番号7および8で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして用い、ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ib株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液からジーンクリーンIIキット(バイオ101社製)を用いて増幅断片を回収し、該DNAのTE溶解液 20 μ lを得た。

【0085】

該溶解液 5 μ lを用い、DNAを制限酵素 EcoIおよび XhoIで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキットにより 1.0 kbのDNA断片を回収した。

pBluescriptII SK(+) DNA 0.2 μ gを制限酵素 EcoRIおよび XhoIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、ジーンクリーンIIキットを用いて 3.0 kbのDNA断片を回収した。

【0086】

該 1.0 kb および 3.0 kb の断片をライゲーションキットを用いて、16℃で16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いて大腸菌JM109株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。

【0087】

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、発現プラスミドであるpBBPJを得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(図2)。

ストレプトコッカス・アガラクチエ type 1b 由来の β 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質をコードする DNA を含有するプラスミドpBBPJを保有する大腸菌 Escherichia coli JM109/pBBPJは、平成12年12月21日付けで、工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)にFERM BP-7400として寄託されている。

実施例3 ラクトーN-テトラオースの生産

実施例2で得られたEscherichia coli JM109/pBBPJ株およびJM109/pBBPJ株をそれぞれアンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 培地 8 ml の入った太型試験管に接種し37℃で17時間培養した。該培養液をアンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 培地 8 ml の入った太型試験管に1%接種し37℃で5時間培養後、1 mmol/l となるようにIPTGを添加した。さらに2時間培養した後、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体から公知の方法[J. Biol. Chem., 272, 19502 (1997)、Mol. Microbiol., 26, 197 (1997)]に従って膜画分を調製した。該膜画分は必要に応じて-80℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0088】

受容体糖質となるラクトーN-トリオースIIは、ラクトーN-ネオテトラオース(シグマ社製)に β -ガラクトシダーゼ(生化学工業社製)を作用させ、非還元末端のガラクトースを完全に除去した後、100℃で5分間熱処理することにより β -ガラクトシダーゼ活性を失活させることにより調製した。

JM109/pBBPJ株膜画分(200 μ g/ml)、50 mmol/l クエン酸バッファー (pH 7.0)

、5 mmol/l $MnCl_2$ 、10 mmol/l ラクトーN-トリオースII、5 mmol/l UD
P-ガラクトースからなる 0.1 mlの反応液中で、37°Cで72時間反応を行った。

【0089】

反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置(DX-500)を用いて以下の分析条件で分析し、反応液中に 0.2 mmol/lのラクトーN-テトラオースが生成蓄積していることを確認した。

同様にJM109/pBBPJ株の膜画分を用いた場合には、0.05 mmol/lのラクトーN-テトラオースが生成蓄積していることが確認できた。

分析条件：

カラム：CarboPAC PA10

溶離液：A； H_2O 、B；500 mmol/l NaOH

グラジエント：10-70% B in 20 min

検出器：パルスドアンペロメトリー検出器

【0090】

【発明の効果】

本発明により、N-アセチルグルコサミンに β 1，3結合でガラクトースを転移する活性を有する微生物由来の β 1，3-ガラクトース転移酵素が提供される。該酵素を用いることにより効率的にガラクトース含有糖質を製造できる。

【0091】

【配列表フリーテキスト】

配列番号4：合成DNA

配列番号5：合成DNA

配列番号6：合成DNA

配列番号7：合成DNA

配列番号8：合成DNA

【 0 0 9 2 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Beta 1,3-galactosyltransferase and a DNA coding for said enzyme

<130> H12-2111A4

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211>

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae Type Ib

<400> 1

Met Asn Tyr Ser Ile Ile Met Ser Val Tyr Asn Glu Pro Leu Asn Tyr

1

5

10

15

Val Arg Asp Ser Val Glu Ser Ile Leu Asn Gln Thr Leu Thr Asp Phe

20

25

30

Glu Phe Ile Ile Val Ile Asp Asn Pro Ser Arg Gly Asp Leu Lys Gln

35

40

45

Phe Leu Thr Glu Tyr Ser Val Val Asp Asn Arg Ile Lys Ile Leu Leu

50

55

60

Asn Glu Glu Asn Ile Gly Leu Ala Ser Ser Leu Asn Lys Ala Val Lys

65

70

75

80

Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Ile Phe Arg Met Asp Ala Asp Asp Ile Ser

85

90

95

Tyr Pro Ser Arg Phe Asp Lys Gln Ile Arg Phe Met Glu Glu Asn Ser

100

105

110

Leu Asp Phe Ser Ala Thr Leu Ile Glu Leu Ile Asp Gln Lys Gly Asn

115

120

125

Leu Val Tyr Lys Lys Gln Arg Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Leu Thr Asn Asp

130

135

140

Ile Arg Lys Met Leu Leu Asn Arg Ser Ile Leu Ala His Pro Thr Trp

145

150

155

160

Cys Val Lys Lys Lys Val Phe Asp Lys Leu Met Gly Tyr Arg Asp Leu

165

170

175

Val Pro Val Glu Asp Tyr Asp Phe Ala Ile Arg Gly Ala Leu Ala Asp

180

185

190

Phe Lys Ile Gly Leu Leu Asn Lys Val Leu Leu Gln Tyr Arg Leu Asn

195

200

205

Glu Asn Gly Ile Ser Gln Thr Asn Lys Phe Lys Gln Tyr Ile Tyr Ser

210

215

220

Ala Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Lys Glu Lys Ser Tyr Ile Asp Ile Thr

225

230

235

240

Lys Ile Thr Asn Tyr Phe Gln Glu Tyr Val Ile Lys Lys Arg Tyr Thr

245

250

255

Gln Gln Glu Leu Ser Lys Tyr Phe Glu Leu Lys Ser Thr Pro Ser Ile

260

265

270

Thr Ile Arg Lys Leu Tyr Ile Cys Leu Tyr Leu Tyr Phe Lys Ser Pro

275

280

285

Leu Val Arg Arg Leu Leu Ile Asn Asp Ile Asn Ile Leu Val Leu Lys

290

295

300

Leu Phe Gly Gly Glu Lys Gln Ser Asp

305

310

313

<210> 2

<211>

<212> DNA

<213> Streptococcus agalactiae Type Ib

<400> 2

atg aat tat agt atc att atg tcg gta tat aat gag cct tta aat tat 48

Met Asn Tyr Ser Ile Ile Met Ser Val Tyr Asn Glu Pro Leu Asn Tyr

1

5

10

15

gtg aga gat tca gta gaa tct ata tta aat caa acg ctt act gat ttt 96

Val Arg Asp Ser Val Glu Ser Ile Leu Asn Gln Thr Leu Thr Asp Phe

20

25

30

gag ttc ata att gtc att gat aat cca agt aga ggt gat tta aag caa 144

Glu Phe Ile Ile Val Ile Asp Asn Pro Ser Arg Gly Asp Leu Lys Gln

35

40

45

ttc tta aca gaa tat tca gtt gta gat aat aga ata aaa atc ttg ctt 192

Phe Leu Thr Glu Tyr Ser Val Val Asp Asn Arg Ile Lys Ile Leu Leu

50

55

60

aat gaa gaa aat att ggt tta gca tca agt ttg aac aaa gcg gtg aaa 240

Asn Glu Glu Asn Ile Gly Leu Ala Ser Ser Leu Asn Lys Ala Val Lys

65

70

75

80

att tct aag gga gaa tat att ttt aga atg gat gct gat gat att tca 288

Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Ile Phe Arg Met Asp Ala Asp Asp Ile Ser

85

90

95

tat cca agt aga ttt gat aag caa att cgt ttt atg gag gaa aat tca 336

Tyr Pro Ser Arg Phe Asp Lys Gln Ile Arg Phe Met Glu Glu Asn Ser

100

105

110

ttg gat ttc tca gca act cta ata gaa ttg ata gac caa aaa gga aat 384

Leu Asp Phe Ser Ala Thr Leu Ile Glu Leu Ile Asp Gln Lys Gly Asn

115

120

125

tta gta tat aaa caa cga gaa agt aat aaa ata tac tta act aat gat 432

Leu Val Tyr Lys Gln Arg Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Leu Thr Asn Asp

130

135

140

ata cgg aag atg tta ttg aat aga tct ata ctt gcc cac cca acg tgg 480

Ile Arg Lys Met Leu Leu Asn Arg Ser Ile Leu Ala His Pro Thr Trp

145

150

155

160

tgc gta aaa aag aaa gtt ttc gat aag tta atg gga tat aga gat tta 528

Cys Val Lys Lys Lys Val Phe Asp Lys Leu Met Gly Tyr Arg Asp Leu

165

170

175

gta cct gtt gaa gat tat gat ttt gca ata aga gga gct ctg gct gat 576

Val Pro Val Glu Asp Tyr Asp Phe Ala Ile Arg Gly Ala Leu Ala Asp

180

185

190

ttc aaa atc ggc tta ctc aat aaa gta ctt tta cag tat aga tta aac 624

Phe Lys Ile Gly Leu Leu Asn Lys Val Leu Leu Gln Tyr Arg Leu Asn

195

200

205

gag aat gga ata tca caa acc aat aag ttt aag caa tat att tac tca 672

Glu Asn Gly Ile Ser Gln Thr Asn Lys Phe Lys Gln Tyr Ile Tyr Ser

210

215

220

gct att tta caa gat ttt tat aaa gaa aaa tct tat att gat atc aca 720

Ala Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Lys Glu Lys Ser Tyr Ile Asp Ile Thr

225 230 235 240

aaa att act aat tac ttt caa gag tat gtg ata aag aaa cgc tat act 768

Lys Ile Thr Asn Tyr Phe Gln Glu Tyr Val Ile Lys Lys Arg Tyr Thr

245 250 255

cag caa gag ctc tct aaa tat ttt gag cta aaa tct acc cct agt att 816

Gln Gln Glu Leu Ser Lys Tyr Phe Glu Leu Lys Ser Thr Pro Ser Ile

260 265 270

act att aga aaa cta tat att tgt tta tat tta tac ttt aag tct ccc 864

Thr Ile Arg Lys Leu Tyr Ile Cys Leu Tyr Leu Tyr Phe Lys Ser Pro

275 280 285

ttg gtt agg agg tta tta ata aat gat att aat att tta gta ctg aaa 912

Leu Val Arg Arg Leu Leu Ile Asn Asp Ile Asn Ile Leu Val Leu Lys

290 295 300

ttg ttt gga gga gag aaa caa agt gac 939

Leu Phe Gly Gly Glu Lys Gln Ser Asp

305 310

<210> 3

<211> 6865

<212> DNA

<213> Streptococcus agalactiae Type Ib

<220>

<221> CDS

<222> (617)..(1789)

<220>

<221> CDS

<222> (1816)..(2262)

<220>

<221> CDS

<222> (2265)..(2744)

<220>

<221> CDS

<222> (2843)..(3979)

<220>

<221> CDS

<222> (3982)..(4953)

<220>

<221> CDS

<222> (5009)..(5947)

<400> 3

agatcttgga gatattatct gtgaaaccaa tgttcctaga ctgatggtcg ttccttcagg 60

gaaagtacca ccaaatecaa cagcattact tcagaacgct tattttaata agatgattga 120

agctattaataa aatatatttg attatattat catcgataact ccacctattg gtttagttgt 180

tgatgccgca ataatcgcta atgcttgcca tggttttatt ttagtaaccc aagcaggtag 240

aataaaacgt aattatgttg aaaaagcaaa agaacagatg gaacaaagtg gttcaaagtt 300

cttaggtatt attcttaata aagttaatga atctgttgct acttacggcg attatggaaa 360

ttacggaaaa agggatagaa aaaggaagta aggggctctt gtattgaaag aaaaagaaaa 420

tatacaaaaag attattatag cgatgattca aaccgttggtg gtttattttt ctgcaagttt 480

gacattaaca ttaattactc ccaactttaa aagcaataaa gatttattgt ttgttctatt 540

gatacattat attgtctttt atctttctga tttttacaga gacttttgga gtcgtggcta 600

tcttgaagag tttaaa atg gta ttg aaa tac agc ttt tac tat att ttc ata 652

Met Val Leu Lys Tyr Ser Phe Tyr Tyr Ile Phe Ile

1 5 10

tca agt tca tta ttt ttt att tct aaa aac tct ttt aca acg aca cga 700

Ser Ser Ser Leu Phe Phe Ile Ser Lys Asn Ser Phe Thr Thr Thr Arg

15 20 25

ctt tcc ttt ttt act ttt att gct atg aat tcg att tta tta tat cta 748

Leu Ser Phe Phe Thr Phe Ile Ala Met Asn Ser Ile Leu Leu Tyr Leu

30 35 40

ttg aat tca ttt tta aaa tat tat cga aaa tat tct tac gct aag ttt 796

Leu Asn Ser Phe Leu Lys Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ser Tyr Ala Lys Phe

45 50 55 60

tca cga gat acc aaa gtt gtt ttg ata acg aat aag gat tct tta tca 844

Ser Arg Asp Thr Lys Val Val Leu Ile Thr Asn Lys Asp Ser Leu Ser

65 70 75

aaa atg acc ttt agg aat aaa tac gac cat aat tat atc gct gtc tgt 892

Lys Met Thr Phe Arg Asn Lys Tyr Asp His Asn Tyr Ile Ala Val Cys

80 85 90

atc ttg gat tcc tct gaa aag gat tgt tat gat ttg aaa cat aac tcg 940

Ile Leu Asp Ser Ser Glu Lys Asp Cys Tyr Asp Leu Lys His Asn Ser

95 100 105

tta agg ata ata aac aaa gat gct ctt act tca gag tta acc tgc tta 988

Leu Arg Ile Ile Asn Lys Asp Ala Leu Thr Ser Glu Leu Thr Cys Leu

110 115 120

act gtt gat caa gct ttt att aac ata ccc att gaa tta ttt ggt aaa 1036

Thr Val Asp Gln Ala Phe Ile Asn Ile Pro Ile Glu Leu Phe Gly Lys

125 130 135 140

tac caa ata caa gat att att aat gac att gaa gca atg gga gtg att 1084

Tyr Gln Ile Gln Asp Ile Ile Asn Asp Ile Glu Ala Met Gly Val Ile

145 150 155

gtc aat gtt aat gta gag gca ctt agc ttt gat aat ata gga gaa aag 1132

Val Asn Val Asn Val Glu Ala Leu Ser Phe Asp Asn Ile Gly Glu Lys

160

165

170

cga atc caa act ttt gaa gga tat agt gtt att aca tat tct atg aaa 1180

Arg Ile Gln Thr Phe Glu Gly Tyr Ser Val Ile Thr Tyr Ser Met Lys

175

180

185

ttc tat aaa tat agt cac ctt ata gca aaa cga ttt ttg gat atc atg 1228

Phe Tyr Lys Tyr Ser His Leu Ile Ala Lys Arg Phe Leu Asp Ile Met

190

195

200

ggt gct att ata ggt ttg ctc ata tgt ggc att gtg gca att ttt cta 1276

Gly Ala Ile Ile Gly Leu Leu Ile Cys Gly Ile Val Ala Ile Phe Leu

205

210

215

220

gtt ccg caa atc aga aaa gat ggt gga ccg gct atc ttt tct caa aat 1324

Val Pro Gln Ile Arg Lys Asp Gly Gly Pro Ala Ile Phe Ser Gln Asn

225

230

235

aga gta ggt cgt aat ggt agg att ttt aga ttc tat aaa ttc aga tca 1372

Arg Val Gly Arg Asn Gly Arg Ile Phe Arg Phe Tyr Lys Phe Arg Ser

240

245

250

atg cga gta gat gca gaa caa att aag aaa gat tta tta gtt cac aat 1420

Met Arg Val Asp Ala Glu Gln Ile Lys Lys Asp Leu Leu Val His Asn

255

260

265

caa atg acg ggg cta atg ttt aag tta gac gat gat cct aga att act 1468

Gln Met Thr Gly Leu Met Phe Lys Leu Asp Asp Asp Pro Arg Ile Thr

270

275

280

aaa ata gga aaa ttt att cga aaa aca agc ata gat gag ttg cct caa 1516

Lys Ile Gly Lys Phe Ile Arg Lys Thr Ser Ile Asp Glu Leu Pro Gln

285

290

295

300

ttc tat aat gtt tta aaa ggt gat atg agt tta gta gga aca cgc cct 1564

Phe Tyr Asn Val Leu Lys Gly Asp Met Ser Leu Val Gly Thr Arg Pro

305

310

315

ccc aca gtt gat gaa tat gaa aag tat aat tca acg cag aag cga cgc 1612

Pro Thr Val Asp Glu Tyr Glu Lys Tyr Asn Ser Thr Gln Lys Arg Arg

320

325

330

ctt agt ttt aag cca gga atc act ggt ttg tgg caa ata tct ggt aga 1660

Leu Ser Phe Lys Pro Gly Ile Thr Gly Leu Trp Gln Ile Ser Gly Arg

335

340

345

aat aat att act gat ttt gat gaa atc gta aag tta gat gtt caa tat 1708

Asn Asn Ile Thr Asp Phe Asp Glu Ile Val Lys Leu Asp Val Gln Tyr

350

355

360

atc aat gaa tgg tct att tgg tca gat att aag att att ctc cta acg 1756

Ile Asn Glu Trp Ser Ile Trp Ser Asp Ile Lys Ile Ile Leu Leu Thr

365

370

375

380

cta aag gta gtt tta ctc ggg aca gga gct aag taaagtaag gtttgaaagg 1809

Leu Lys Val Val Leu Leu Gly Thr Gly Ala Lys

385

390

aatata atg aaa att tgt ctg gtt ggt tca agt ggt ggt cac cta gca 1857

Met Lys Ile Cys Leu Val Gly Ser Ser Gly Gly His Leu Ala

395

400

405

cac ttg aac ctt ttg aaa ccc att tgg gaa aaa gaa gat agg ttt tgg 1905

His Leu Asn Leu Leu Lys Pro Ile Trp Glu Lys Glu Asp Arg Phe Trp

410

415

420

gta act ttt gat aaa gaa gat gct agg agt att cta aga gaa gag att 1953

Val Thr Phe Asp Lys Glu Asp Ala Arg Ser Ile Leu Arg Glu Glu Ile

425

430

435

gta tat cat tgc ttc ttt cca aca aac cgt aat gtc aaa aac ttg gta 2001

Val Tyr His Cys Phe Phe Pro Thr Asn Arg Asn Val Lys Asn Leu Val

440

445

450

aaa aat act att cta gct ttt aag gtc ctt aga aaa gaa aga cca gat 2049

Lys Asn Thr Ile Leu Ala Phe Lys Val Leu Arg Lys Glu Arg Pro Asp

455

460

465

gtt atc ata tca tct ggt gcc gct gta gca gta cca ttc ttt tat att 2097

Val Ile Ile Ser Ser Gly Ala Ala Val Ala Val Pro Phe Phe Tyr Ile

470

475

480

485

ggc aag tta ttt ggc tgt aag acc gtt tat ata gag gtt ttc gac agg 2145

Gly Lys Leu Phe Gly Cys Lys Thr Val Tyr Ile Glu Val Phe Asp Arg

490

495

500

ata gat aaa cca act ttg aca gga aaa tta gtg tat cct gta aca gat 2193

Ile Asp Lys Pro Thr Leu Thr Gly Lys Leu Val Tyr Pro Val Thr Asp

505

510

515

aaa ttt att gtt cag tgg gaa gaa atg aaa aaa gtt tat cct aag gca 2241

Lys Phe Ile Val Gln Trp Glu Glu Met Lys Lys Val Tyr Pro Lys Ala

520

525

530

att aat tta gga gga att ttt ta atg att ttt gtc aca gta ggg aca 2288

Ile Asn Leu Gly Gly Ile Phe Met Ile Phe Val Thr Val Gly Thr

535

540

545

cat gaa cag cag ttc aac cgt ctt att aaa gaa gtt gat aga tta aaa 2336

His Glu Gln Gln Phe Asn Arg Leu Ile Lys Glu Val Asp Arg Leu Lys

550

555

560

ggg aca ggt gct att gat caa gaa gtg ttc att caa acg ggt tac tca 2384

Gly Thr Gly Ala Ile Asp Gln Glu Val Phe Ile Gln Thr Gly Tyr Ser

565

570

575

580

gac ttt gaa cct cag aat tgt cag tgg tca aaa ttt ctc tca tat gat 2432

Asp Phe Glu Pro Gln Asn Cys Gln Trp Ser Lys Phe Leu Ser Tyr Asp

585

590

595

gat atg aac tct tac atg aaa gaa gct gag att gtt atc aca cac ggc 2480

Asp Met Asn Ser Tyr Met Lys Glu Ala Glu Ile Val Ile Thr His Gly

600

605

610

ggg cca gca acg ttt atg aat gca gtt tct aaa ggg aaa aaa act att 2528

Gly Pro Ala Thr Phe Met Asn Ala Val Ser Lys Gly Lys Lys Thr Ile

615

620

625

gtg gtt cct aga caa gaa cag ttt gga gag cat gtg aat aat cat cag 2576

Val Val Pro Arg Gln Glu Gln Phe Gly Glu His Val Asn Asn His Gln

630

635

640

gtg gat ttt ttg aaa gag tta ttc ttg aaa tat gag tta gat tat att 2624

Val Asp Phe Leu Lys Glu Leu Phe Leu Lys Tyr Glu Leu Asp Tyr Ile

645

650

655

660

ttg aat atc agt gaa tta gag aat att att aag gaa aaa aat ata tct 2672

Leu Asn Ile Ser Glu Leu Glu Asn Ile Ile Lys Glu Lys Asn Ile Ser

665

670

675

act agt aaa gta ata tca caa aac aat gat ttt tgt tcc tct ttc aaa 2720

Thr Ser Lys Val Ile Ser Gln Asn Asn Asp Phe Cys Ser Ser Phe Lys

680

685

690

aat gaa ctt tct aaa cta ttt gaa taaatatatt ttgttggaga aaaaaattga 2774

Asn Glu Leu Ser Lys Leu Phe Glu

695

700

aattaactat caatccaaag tatttgtaa taggaggaat ttctgcttta accctatattt 2834

caaagcca atg caa ctt ttg tta ctt tta gca tta ata gtt tta ctt att 2884

Met Gln Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Ile Val Leu Leu Ile

705

710

tgt agt agt tat aat gaa aaa atg aaa ttt tta aat atg gct gaa att 2932

Cys Ser Ser Tyr Asn Glu Lys Met Lys Phe Leu Asn Met Ala Glu Ile

715

720

725

730

ttt ttc att gta ttt tat atg gtt tat tta gta tca ata gta tta aat 2980

Phe Phe Ile Val Phe Tyr Met Val Tyr Leu Val Ser Ile Val Leu Asn

735

740

745

tcg tta ttt aga agt cca gaa ttt cat aga gtc att gct gca ttc aat 3028

Ser Leu Phe Arg Ser Pro Glu Phe His Arg Val Ile Ala Ala Phe Asn

750

755

760

tca ctg gca gta ggg gtt gtg tcc tta tta ttt tac cat tac tat aag 3076

Ser Leu Ala Val Gly Val Val Ser Leu Leu Phe Tyr His Tyr Tyr Lys

765

770

775

aat act aat att gaa tta aca aaa ttg cta aaa tca ttt ttg ttt aat 3124

Asn Thr Asn Ile Glu Leu Thr Lys Leu Leu Lys Ser Phe Leu Phe Asn

780

785

790

gca att att ttg ttt tgt tta gga ttt cta tat tat tat gcc ata tat 3172

Ala Ile Ile Leu Phe Cys Leu Gly Phe Leu Tyr Tyr Tyr Ala Ile Tyr

795

800

805

810

ttt gat gta gag aat gta agt ctt ttt gga aga aat tta att gga tca 3220

Phe Asp Val Glu Asn Val Ser Leu Phe Gly Arg Asn Leu Ile Gly Ser

815

820

825

gat tgg ata aat ggg atg cat acg cag aga gca atg gct ttc ttt gaa 3268

Asp Trp Ile Asn Gly Met His Thr Gln Arg Ala Met Ala Phe Phe Glu

830

835

840

tat tca aat ctt ata ata ccc tta act atc ata act aat ata tat ata 3316

Tyr Ser Asn Leu Ile Ile Pro Leu Thr Ile Ile Thr Asn Ile Tyr Ile

845

850

855

tat ata tat att aag caa aga tat agc tca ggg atg atg ata ctc ggt 3364

Tyr Ile Tyr Ile Lys Gln Arg Tyr Ser Ser Gly Met Met Ile Leu Gly

860

865

870

gct ctt ctc tcc act att ata cta ccc atc ggg tct gga tct aga gct 3412

Ala Leu Leu Ser Thr Ile Ile Leu Pro Ile Gly Ser Gly Ser Arg Ala

875

880

885

890

ggt att ata gtt gtg cta cta cag gtt ata att tta ttg ttg aat aca 3460

Gly Ile Ile Val Val Leu Leu Gln Val Ile Ile Leu Leu Leu Asn Thr

895

900

905

att gta ata aaa aga caa acg ata aga ttt ttc ctg tat tta gtt ccg 3508

Ile Val Ile Lys Arg Gln Thr Ile Arg Phe Phe Leu Tyr Leu Val Pro

910

915

920

ata cta ata tta cta tta gtg ata tta cgt ttt gat aat ttg gtg agc 3556

Ile Leu Ile Leu Leu Leu Val Ile Leu Arg Phe Asp Asn Leu Val Ser

925

930

935

ata tat aat aga ata atc aat ttg cgg tcg gga agt agt gaa tct aga 3604

Ile Tyr Asn Arg Ile Ile Asn Leu Arg Ser Gly Ser Ser Glu Ser Arg

940

945

950

ttt tct ttg tac aag gat acc gta cac tca gta att act gac tca cta 3652

Phe Ser Leu Tyr Lys Asp Thr Val His Ser Val Ile Thr Asp Ser Leu

955

960

965

970

ttt ctg gga aaa ggt gta aaa gaa ttg tgg tta aat agt gat tta cca 3700

Phe Leu Gly Lys Gly Val Lys Glu Leu Trp Leu Asn Ser Asp Leu Pro

975

980

985

cta gga tcg cat tcg acc tac ata ggt tat ttc tat aaa act ggc cta 3748

Leu Gly Ser His Ser Thr Tyr Ile Gly Tyr Phe Tyr Lys Thr Gly Leu

990

995

1000

ttt gga cta ata aat gtg att tta ggt ttg ttt cta att ctt att agc 3796

Phe Gly Leu Ile Asn Val Ile Leu Gly Leu Phe Leu Ile Leu Ile Ser

1005

1010

1015

att atc aag gaa gct aaa aag tca gat ttc tat tat gag ata gta ggg 3844

Ile Ile Lys Glu Ala Lys Lys Ser Asp Phe Tyr Tyr Glu Ile Val Gly

1020

1025

1030

tct gtc ata ctc cta ttt tca ttt ttt gca ctt gaa gat att gat ggc 3892

Ser Val Ile Leu Leu Phe Ser Phe Phe Ala Leu Glu Asp Ile Asp Gly

1035

1040

1045

1050

gcc aat tgg ctc att att ttt gtc ttt aca gtg ttg gga att tta gaa 3940

Ala Asn Trp Leu Ile Ile Phe Val Phe Thr Val Leu Gly Ile Leu Glu

1055

1060

1065

aat aag gat ttc tat agt caa ctt aaa agg tgg gaa agt ta atg gaa 3987

Asn Lys Asp Phe Tyr Ser Gln Leu Lys Arg Trp Glu Ser Met Glu

1070

1075

1080

aaa caa ata ctt gtt tct atc gtt ata cct ata tac aac tcg gaa gca 4035

Lys Gln Ile Leu Val Ser Ile Val Ile Pro Ile Tyr Asn Ser Glu Ala

1085

1090

1095

tat ctt aaa gaa tgc gtg caa tcc gtc cta caa cag act cat tca ttg 4083

Tyr Leu Lys Glu Cys Val Gln Ser Val Leu Gln Gln Thr His Ser Leu

1100

1105

1110

ata gaa gtt ata ctg att aat gat gga tcc act gat aat agt gga gaa 4131

Ile Glu Val Ile Leu Ile Asn Asp Gly Ser Thr Asp Asn Ser Gly Glu

1115

1120

1125

att tgt gat aat tta tct caa aaa gac gat cgc ata ctt gta ttt cat 4179

Ile Cys Asp Asn Leu Ser Gln Lys Asp Asp Arg Ile Leu Val Phe His

1130

1135

1140

1145

aaa aaa aat gga ggg gta tct tcg gca agg aac cta ggt ctt gat aaa 4227

Lys Lys Asn Gly Gly Val Ser Ser Ala Arg Asn Leu Gly Leu Asp Lys

1150

1155

1160

tcc aca ggc gaa ttc ata acg ttt gta gat agt gat gat ttt gta gca 4275

Ser Thr Gly Glu Phe Ile Thr Phe Val Asp Ser Asp Asp Phe Val Ala

1165

1170

1175

ccg aat ata att gaa ata atg tta aaa aat tta atc act gag gat gct 4323

Pro Asn Ile Ile Glu Ile Met Leu Lys Asn Leu Ile Thr Glu Asp Ala

1180

1185

1190

gat ata gca gaa gta gat ttt gat att tcg aat gag aga gat tat aga 4371

Asp Ile Ala Glu Val Asp Phe Asp Ile Ser Asn Glu Arg Asp Tyr Arg

1195

1200

1205

aag aaa aaa aga cga aac ttt tat aag gtc ttt aaa aac aat aat tct 4419

Lys Lys Lys Arg Arg Asn Phe Tyr Lys Val Phe Lys Asn Asn Asn Ser

1210

1215

1220

1225

tta aaa gaa ttt tta tca ggt aat aga gtg gaa aat att gtt tgt aca 4467

Leu Lys Glu Phe Leu Ser Gly Asn Arg Val Glu Asn Ile Val Cys Thr

1230

1235

1240

aaa tta tat aaa aaa agt ata att ggt aac ttg agg ttt gat gag aat 4515

Lys Leu Tyr Lys Lys Ser Ile Ile Gly Asn Leu Arg Phe Asp Glu Asn

1245

1250

1255

tta aaa att ggt gag gat tta ctt ttt aat tgt aaa att tta tgt caa 4563

Leu Lys Ile Gly Glu Asp Leu Leu Phe Asn Cys Lys Ile Leu Cys Gln

1260

1265

1270

gag cac tgc ata gtc gta gat acg act tct tcc ttg tac acc tat cgc 4611

Glu His Cys Ile Val Val Asp Thr Thr Ser Ser Leu Tyr Thr Tyr Arg

1275

1280

1285

atc gta aag act tct gca atg aat cag gag ttc aac gaa aat tca tta 4659

Ile Val Lys Thr Ser Ala Met Asn Gln Glu Phe Asn Glu Asn Ser Leu

1290

1295

1300

1305

gat ttt ata aca att ttt aat gaa ata agc agt att gtt cct gca aaa 4707

Asp Phe Ile Thr Ile Phe Asn Glu Ile Ser Ser Ile Val Pro Ala Lys

1310

1315

1320

tta gct aat tat gtt gaa gcg aaa ttt tta aga gaa aag gta aag tgt 4755

Leu Ala Asn Tyr Val Glu Ala Lys Phe Leu Arg Glu Lys Val Lys Cys

1325

1330

1335

ctc cga aaa atg ttt gaa tta ggt agt aat att gac agt aaa atc aaa 4803

Leu Arg Lys Met Phe Glu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Ser Lys Ile Lys

1340

1345

1350

tta caa cga gag att ttt ttc aaa gat gtt aaa tta tac cct ttc tat 4851

Leu Gln Arg Glu Ile Phe Phe Lys Asp Val Lys Leu Tyr Pro Phe Tyr

1355

1360

1365

aaa gcg gtt aag tac tta tca tta aag gga tta ttg agt att tac tta 4899

Lys Ala Val Lys Tyr Leu Ser Leu Lys Gly Leu Leu Ser Ile Tyr Leu

1370

1375

1380

1385

atg aaa tgt tca ccc atc ttg tat ata aaa tta tat gac agg ttt caa 4947

Met Lys Cys Ser Pro Ile Leu Tyr Ile Lys Leu Tyr Asp Arg Phe Gln

1390

1395

1400

aaa cag taagtaatca aaaattaaat taactcaatt acctttttaa ttataggagt 5003

Lys Gln

tgaaa atg aat tat agt atc att atg tcg gta tat aat gag cct tta aat 5053

Met Asn Tyr Ser Ile Ile Met Ser Val Tyr Asn Glu Pro Leu Asn

1405

1410

1415

tat gtg aga gat tca gta gaa tct ata tta aat caa acg ctt act gat 5101

Tyr Val Arg Asp Ser Val Glu Ser Ile Leu Asn Gln Thr Leu Thr Asp

1420

1425

1430

ttt gag ttc ata att gtc att gat aat cca agt aga ggt gat tta aag 5149

Phe Glu Phe Ile Ile Val Ile Asp Asn Pro Ser Arg Gly Asp Leu Lys

1435

1440

1445

1450

caa ttc tta aca gaa tat tca gtt gta gat aat aga ata aaa atc ttg 5197

Gln Phe Leu Thr Glu Tyr Ser Val Val Asp Asn Arg Ile Lys Ile Leu

1455

1460

1465

ctt aat gaa gaa aat att ggt tta gca tca agt ttg aac aaa gcg gtg 5245

Leu Asn Glu Glu Asn Ile Gly Leu Ala Ser Ser Leu Asn Lys Ala Val

1470

1475

1480

aaa att tct aag gga gaa tat att ttt aga atg gat gct gat gat att 5293

Lys Ile Ser Lys Gly Glu Tyr Ile Phe Arg Met Asp Ala Asp Asp Ile

1485

1490

1495

tca tat cca agt aga ttt gat aag caa att cgt ttt atg gag gaa aat 5341

Ser Tyr Pro Ser Arg Phe Asp Lys Gln Ile Arg Phe Met Glu Glu Asn

1500

1505

1510

整理番号=H 1 2 - 2 1 1 A 4

tca ttg gat ttc tca gca act cta ata gaa ttg ata gac caa aaa gga 5389

Ser Leu Asp Phe Ser Ala Thr Leu Ile Glu Leu Ile Asp Gln Lys Gly

1515 1520 1525 1530

aat tta gta tat aaa caa cga gaa agt aat aaa ata tac tta act aat 5437

Asn Leu Val Tyr Lys Gln Arg Glu Ser Asn Lys Ile Tyr Leu Thr Asn

1535 1540 1545

gat ata cgg aag atg tta ttg aat aga tct ata ctt gcc cac cca acg 5485

Asp Ile Arg Lys Met Leu Leu Asn Arg Ser Ile Leu Ala His Pro Thr

1550 1555 1560

tgg tgc gta aaa aag aaa gtt ttc gat aag tta atg gga tat aga gat 5533

Trp Cys Val Lys Lys Lys Val Phe Asp Lys Leu Met Gly Tyr Arg Asp

1565 1570 1575

tta gta cct gtt gaa gat tat gat ttt gca ata aga gga gct ctg gct 5581

Leu Val Pro Val Glu Asp Tyr Asp Phe Ala Ile Arg Gly Ala Leu Ala

1580 1585 1590

gat ttc aaa atc ggc tta ctc aat aaa gta ctt tta cag tat aga tta 5629

Asp Phe Lys Ile Gly Leu Leu Asn Lys Val Leu Leu Gln Tyr Arg Leu

1595 1600 1605 1610

aac gag aat gga ata tca caa acc aat aag ttt aag caa tat att tac 5677

Asn Glu Asn Gly Ile Ser Gln Thr Asn Lys Phe Lys Gln Tyr Ile Tyr

1615 1620 1625

tca gct att tta caa gat ttt tat aaa gaa aaa tct tat att gat atc 5725

Ser Ala Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Lys Glu Lys Ser Tyr Ile Asp Ile

1630

1635

1640

aca aaa att act aat tac ttt caa gag tat gtg ata aag aaa cgc tat 5773

Thr Lys Ile Thr Asn Tyr Phe Gln Glu Tyr Val Ile Lys Lys Arg Tyr

1645

1650

1655

act cag caa gag ctc tct aaa tat ttt gag cta aaa tct acc cct agt 5821

Thr Gln Gln Glu Leu Ser Lys Tyr Phe Glu Leu Lys Ser Thr Pro Ser

1660

1665

1670

att act att aga aaa cta tat att tgt tta tat tta tac ttt aag tct 5869

Ile Thr Ile Arg Lys Leu Tyr Ile Cys Leu Tyr Leu Tyr Phe Lys Ser

1675

1680

1685

1690

ccc ttg gtt agg agg tta tta ata aat gat att aat att tta gta ctg 5917

Pro Leu Val Arg Arg Leu Leu Ile Asn Asp Ile Asn Ile Leu Val Leu

1695

1700

1705

aaa ttg ttt gga gga gag aaa caa agt gac taatagaaaa atttatgtat 5967

Lys Leu Phe Gly Gly Glu Lys Gln Ser Asp

1710

1715

gtcatactct ttatcattta ttgatttggt tatataaaga agagatatat tcaaatttag 6027

aaattattct ctcttcttct attcctgatg ttgataattt agagaaaaaa ttaaaatcaa 6087

aaacaataaa tatacatatt ttagaagaat ctagtggtga aagtgaagaa ttattatcag 6147

tacttaaaga tgctggtcta agttatagta agtttgatag taattgtttt atttttaatg 6207

atgcaacgcc tattgggagg acactaataa agcatggtat ttattataat ctaattgaag 6267

atggtttaaa ttgttttact tactctatat ttagtcaaaa actttggaag tattatgtaa 6327

aaaaatatat tcttcacaaa attcagccac atggattttc acgatattgt ttagggattg 6387

aagttaattc attagttaat ttgccaaagg atccgcgtta taaaaaattt attgaagtcc 6447

ctaggaaaga actttttgac aatgtaacag aatatcaaaa agaaatggca ataaatcttt 6507

ttggagcagt aagagttagt attaaatcac cttcagtact agtattaacg cagcctctat 6567

ctatagataa agagtttatg agttataaca ataagataga aacgtccgaa gaacaattta 6627

atttttataa atcaatagtc aatgaatata taaataaagg gtacaatgtt tatttaaaag 6687

ttcctcctag agatgtagta gattattcca aattgccggt agagctatta ccatcaaatg 6747

ttcctatgga aattatagag ttgatgttaa caggtcggtt cgaatgtggg ataacacatt 6807

cgtccactgc gctggatttt ttaacttggt ttgataaaaa aataacttta gtagatct 6865

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 4

gggggatcca atggtattga aatacag

27

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 5

aatctgcaga cttagctcct gtcccgagt

29

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 6

ccaagcggcc gctatagtca acttaaaagg tgg

33

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 7

cggctcgagt cccaataggc gttgcatc 28

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400>

ccggaattcg aaaaggtaaa gtgtctccga aa 32

【図面の簡単な説明】

【図 1】 ストレプトコッカス・アガラクチエ Type Ia株およびType Ib株の夾膜多糖生合成遺伝子の構造を示す。

【図 2】 β 1, 3-ガラクトース転移酵素発現プラスミド pBBPIJ および pBB PJ の造成工程を示す。

【符号の説明】

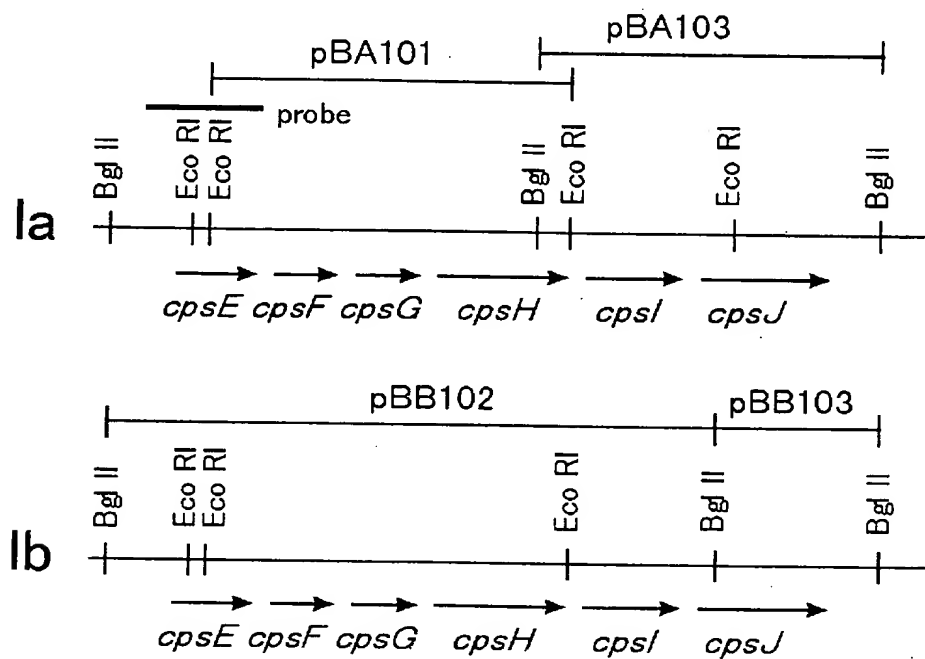
P_{lac} : lacプロモーター

cpsI: β 1, 3-N-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子

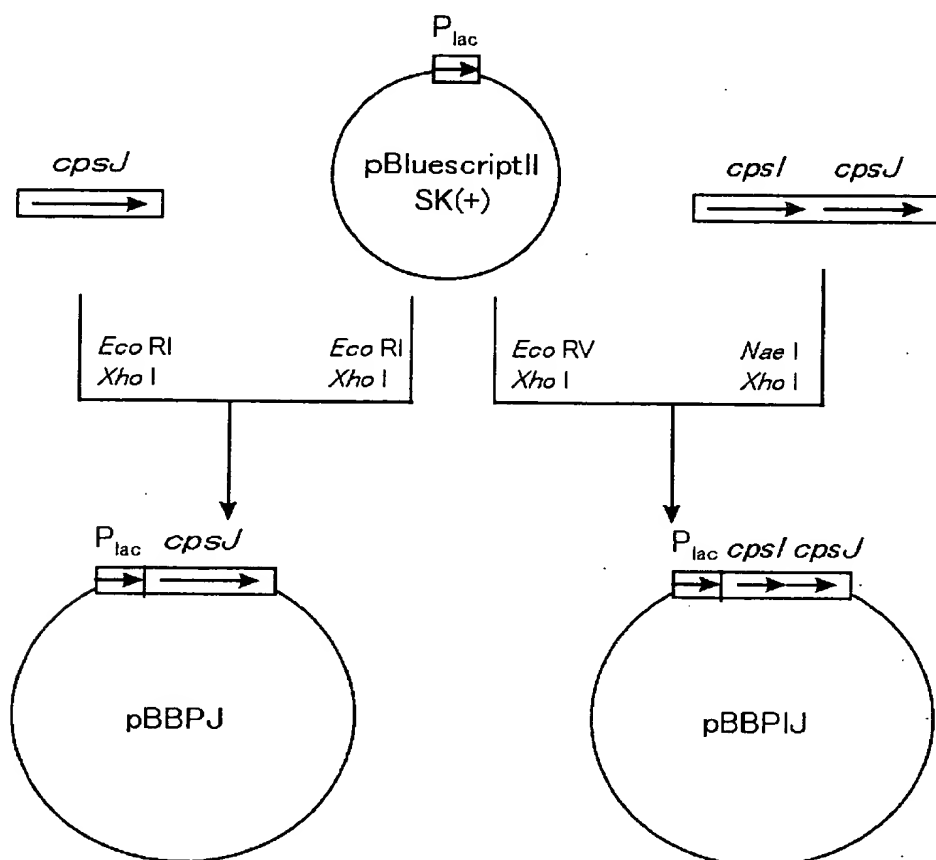
cpsJ: β 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該DNAを用いた β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する蛋白質の製造法、および該蛋白質を用いたガラクトース含有糖鎖の製造法を提供する。

【解決手段】 本発明によれば、 β 1, 3－ガラクトース転移酵素活性を有する新規蛋白質、該蛋白質をコードするDNA、該DNAを含有してなる組換え体DNA、該組換え体DNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体、該形質転換体を用いた上記蛋白質あるいはガラクトース含有糖鎖の製造法を提供することができる。

【選択図】 なし